

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LEONARDO BOZZI MIGLINO

EFEITO DE MILHO NATURALMENTE CONTAMINADO COM  
MICOTOXINAS SOBRE IMUNIDADE E DESEMPENHO EM  
FRANGOS DE CORTE

CURITIBA  
2012

LEONARDO BOZZI MIGLINO

EFEITO DE MILHO NATURALMENTE CONTAMINADO COM  
MICOTOXINAS SOBRE IMUNIDADE E DESEMPENHO EM  
FRANGOS DE CORTE

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração: Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Santin

CURITIBA  
2012


**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**




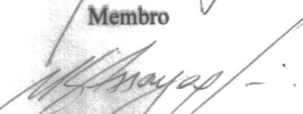
**PARECER**

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada **"EFEITO DO MILHO NATURALMENTE CONTAMINADO COM MICOTOXINAS SOBRE IMUNIDADE E DESEMPENHO EM FRANGOS DE CORTE"** apresentada pelo Mestrando **LEONARDO BOZZI MIGLINO** declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09-CEPE/UFPR, que considerou o candidato .....Apelo..... para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 27 de fevereiro de 2012

  
Professora Dra. Elizabeth Santin  
Presidente/Orientadora

  
Dr. Alberto Back  
Membro

  
Dr. Mario Sergio Assayag  
Membro

A melhor família e  
aos melhores amigos  
do mundo, de coração,  
DEDICO.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me iluminado em mais uma jornada. Obrigado por mais essa etapa profissional e pessoal concluída.

À minha família, meu tudo. Por toda educação, ensinamentos, dedicação e amor incondicional. Família essa vitória também é de vocês.

À Universidade Federal do Paraná, ao Curso de Medicina Veterinária e ao Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, pela excelência na minha formação acadêmica e profissional. Meus agradecimentos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Santin, orientadora, mestre e grande amiga. Obrigado por me guiar desde a graduação e ter acreditado no meu potencial.

Ao Laboratório de Microbiologia e Ornitopatologia da UFPR, minha segunda casa. Em especial, Louise e Maristela, grandes profissionais e amigas. Mariana, Leandro, Larissa, Patrick e a todos os estagiários que já passaram e contribuíram de alguma forma. Sem o apoio e a amizade de vocês jamais teria chegado até aqui.

Aos professores doutores Ana Vitória Fischer da Silva e Geraldo Camilo Alberton. Obrigado pelas orientações e ensinamentos.

A todos os meus amigos, de longa data e da faculdade. Obrigado pela lealdade e amizade eterna.

A Capes, pela concessão de bolsa durante a realização do curso de mestrado.

A todos que, de uma forma ou de outra, me ajudaram a chegar até aqui.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	viii
RESUMO GERAL .....	8
ABSTRACT .....	9
INTRODUÇÃO GERAL .....	10
REFERÊNCIAS .....	12
CAPÍTULO I .....	14
IMPACTO DE MILHO NATURALMENTE CONTAMINADO SOBRE PARÂMETROS PRODUTIVOS, ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO - REVISÃO DE LITERATURA .....	14
RESUMO .....	15
ABSTRACT .....	15
INTRODUÇÃO .....	16
QUALIDADE DO MILHO, CRESCIMENTO FÚNGICO E PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS .....	17
EFEITO DO MILHO NATURALMENTE CONTAMINADO SOBRE A PRODUÇÃO E SAÚDE ANIMAL COMPARADO AO USO DE TOXINA PURIFICADA. ....	22
EFEITO DOS GRÃOS DE MILHO NATURALMENTE CONTAMINADOS SOBRE A RESPOSTA IMUNOLÓGICA DO TRATO GASTROINTESTINAL DOS ANIMAIS DE PRODUÇÃO .....	28
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	30
REFERÊNCIAS .....	31
CAPÍTULO II .....	36
DIETAS CONTENDO MILHO NATURALMENTE CONTAMINADO COM MICOTOXINAS SOBRE MORFOFISIOLOGIA HEPÁTICA E RESPOSTA IMUNOLÓGICA INTESTINAL EM FRANGOS DE CORTE .....	36
RESUMO .....	37
ABSTRACT .....	37
INTRODUÇÃO .....	38
MATERIAL E MÉTODOS .....	40
ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	45
RESULTADOS .....	46
DISCUSSÃO .....	54
CONCLUSÕES .....	57
REFERÊNCIAS .....	58
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	62

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Fígado, Frango de corte, 35 dias. T1 = dieta controle e T2 = dieta com milho naturalmente contaminado. Notar alterações de coloração, tamanho e forma de fígado dos animais pertencentes ao T2. ....48
- FIGURA 2. Células hepáticas, frango. T1 = dieta controle e T2 = dieta com milho naturalmente contaminado. A - T1 apresentando escore 1 de vacuolização (Aumento de 40x); B - T2 apresentando grau 3 de vacuolização e grau 2 de megalocitose (Aumento de 40x) e C - T2 proliferação de ductos biliares (Aumento de 20x). ....48
- FIGURA 3. Quantificação de linfócitos T CD4+ e CD8+ no duodeno, jejuno, íleo e ceco das aves aos 7, 17 e 35 dias de vida nos diferentes grupos experimentais, sendo T1 aves alimentados com milho normal e T2 aves alimentadas com milho naturalmente contaminados. ....52

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

TABELA 1. Principais parâmetros e seus níveis de tolerância no grão de milho utilizado por empresas produtoras de rações.....	18
TABELA 2. Micotoxinas, agentes fungicos que as produzem e suas propriedades tóxicas em animais domésticos.....	22

### CAPÍTULO 2

TABELA 1. Composição das dietas experimentais. ....	41
TABELA 2. Composição bromatológica e micotoxicológica dos grãos de milho utilizados nas formulações das dietas experimentais.....	42
TABELA 3. Concentrações de micotoxinas e atividade de água nas dietas experimentais. ....	43
TABELA 4. Estabelecimento de escores de lesão e os pontos utilizados para avaliar as lesões histológicas. ....	44
TABELA 5. Efeito de dietas contaminadas com aflatoxinas no ganho de peso de frangos de corte. ....	46
TABELA 6. Efeito de dietas com milho naturalmente contaminado sobre alterações macroscópicas de fígado, rins, musculatura e intestino e microscópicas de fígado em frangos de corte de 1 a 35 dias de idade. ....	47
TABELA 7. Contagem de células caliciformes e diferentes fenótipos de linfócitos em fragmentos intestinais, aos 07 dias, de frangos de corte alimentados com dietas contendo milho naturalmente contaminadas por micotoxina.....	50
TABELA 8. Contagem de células caliciformes e diferentes fenótipos de linfócitos em fragmentos intestinais, aos 17 dias, de frangos de corte alimentados com dietas contendo milho naturalmente contaminadas por micotoxina.....	51
TABELA 9. Contagem de células caliciformes e diferentes fenótipos de linfócitos em fragmentos intestinais, aos 35 dias, de frangos de corte alimentados com dietas contendo milho naturalmente contaminadas por micotoxina.....	51
TABELA 10. Dinâmica populacional de células linfóides no plasma sanguíneo de aves expostas a dietas contendo milho naturalmente contaminado com micotoxinas. ....	53



## Resumo Geral

A produção animal demanda grande quantidade de milho para produção de rações. Entretanto nem sempre esta grande quantidade de cereais possui logística adequada de transporte e estocagem. Estas condições podem favorecer o desenvolvimento de fungos que podem prejudicar a qualidade destas matérias-primas por meio do consumo dos nutrientes e/ou produção de metabólitos tóxicos, chamados micotoxinas, que por sua vez tem efeitos diretos sobre a saúde e produção animal. Apesar de se conhecer os efeitos nocivos de micotoxinas na produção de aves, poucos estudos avaliam o efeito destes grãos naturalmente contaminados com fungos e micotoxinas sobre parâmetros patológicos, imunológicos e produtivos das aves. Com o objetivo de estudar o impacto de milho naturalmente contaminados sobre a saúde e desempenho de frangos de corte, a presente dissertação foi dividida em dois capítulos: Capítulo I que apresenta uma revisão bibliográfica sobre “Impacto de milho naturalmente contaminado sobre parâmetros produtivos, alterações morfológicas e resposta imunológica em animais de produção” e no Capítulo II um trabalho científico denominado “Dietas contendo milho naturalmente contaminado sobre parâmetros produtivos, alterações morfológicas e resposta imunológica intestinal em frangos de corte”. No trabalho aves foram divididas em dois tratamentos (T1 = dieta controle; T2 = dieta controle contendo milho naturalmente contaminado) e observou-se que frangos alimentados com milho naturalmente contaminado com micotoxinas apresentaram menor ganho de peso, maior escore de lesão hepática e renal e redução na população de células CD4+ e CD8+ no intestino comparado aos frangos do grupo controle.

**Palavras-chave:** Aflatoxina, parâmetro de crescimento, lesão hepática, CD4+, CD8+.

## **Abstract**

Animal production demands a large amount of corn to produce rations. However, this large amount of cereal demand is not always logistically properly stored and transported. These conditions may favor the growth of fungi that can impair the quality of these raw materials through nutrient consumption and/or production of toxic metabolites, called mycotoxins, which in turn can produce direct effects on the health and production of animals. Despite the knowledge about the harmful effects of mycotoxins in poultry production, few studies evaluate the effect of grains naturally contaminated with fungi and mycotoxins on pathological, immunological, and productive parameters in birds. This dissertation was divided in two chapters with the objective to study the impact of naturally contaminated corn on the health and performance of broilers. Chapter I presents a literature review on "Impact of naturally contaminated corn on productive parameters, morphological alterations, and immunological response in production animals", and Chapter II presents a scientific study entitled " The effects of diets containing naturally contaminated corn on productive parameters, morphological alterations, and intestinal immunological response in broilers ". The birds were divided in two treatment groups (T1 = control diet; T2 = control diet containing naturally contaminated corn). The results showed that the broilers fed with naturally contaminated corn with mycotoxins presented less weight gain, higher hepatic and renal lesion score, and reduction in the population of CD4+ and CD8+ cells in the intestine than the broilers in the control group.

**Keywords:** aflatoxin, growth parameter, liver lesion, CD4 +, CD8 +

## Introdução Geral

O significativo avanço dos sistemas intensivos de produção animal é uma das causas e consequências do aumento da produção de grãos (SANTIN, 2005), sendo milho o grão utilizado em maior quantidade nas formulações devido a suas qualidades nutricionais.

Os parâmetros de qualidade do milho podem ser afetados por inúmeros fatores durante todas as etapas da cadeia produtiva (desenvolvimento, maturação, transporte, colheita, secagem, armazenamento) (SANTIN, 2005). Essas alterações estão relacionadas à contaminação dos grãos de milho por diversos microorganismos (principalmente fungos), o que pode resultar em perdas no desempenho animal e, conseqüentemente, na lucratividade da produção.

As rações podem conter uma microbiota diversa adquirida de múltiplas fontes ambientais (MACIOROWSKI *et al.*, 2007). A colonização do milho e rações por fungos causa redução do conteúdo de óleo dos grãos, implicando na redução de sua energia metabolizável (FARONI, 2005).

Além disso, alterações de temperatura, umidade, aeração e a presença de agentes agressivos (SANTIN, 2005), tornam o ambiente desfavorável para os fungos induzindo a condição de estresse com consequente produção de micotoxinas. Estas micotoxinas são consideradas metabólitos secundários, de baixo peso molecular e não essenciais para o crescimento fúngico (BOUHET e OSWALD, 2005).

Grande parte do milho produzidos no mundo apresenta algum grau de contaminação natural com micotoxinas. Analisando milho em grão nos Estados Unidos, QUIST *et al.*, (2000) encontrou 51% de positividade das amostras para micotoxinas. Dados semelhantes foram encontrados no Brasil, onde 40% das

amostras analisadas nos últimos 20 anos foram também positivas para micotoxinas, sendo aflatoxina a mais detectada, com concentração média de 25 ppb (LAMIC, 2012).

Em animais de produção os impactos destas toxinas causam decréscimo no ganho de peso, eficiência alimentar, na produção de carne e ovos e aumento da incidência de doenças devido à supressão do sistema imune (CAST, 2003) o que pode acarretar sérios problemas relacionados à saúde pública. Este quadro imunossupressivo leva ao decréscimo na resistência a doenças infecciosas em animais de produção, podendo resultar em menor resposta vacinal e maior transmissão de patógenos para humanos (OSWALD *et al.*, 2005).

A maioria dos trabalhos relatando prejuízos causados por micotoxinas faz uso destas substâncias purificadas adicionadas a cereais de boa qualidade. No entanto, em condições reais, a alimentação contendo milho naturalmente contaminado com múltiplas micotoxinas e com alterações nutricionais ocasionado por fungos é bastante comum em criação animal (CHOWDHURY *et al.*, 2005; GIRISH *et al.*, 2010). Segundo HARVEY *et al.*, (1991) essa interação entre toxinas nos grãos contaminados pode trazer efeitos mais tóxicos do que quando doses equivalentes destas toxinas purificadas são adicionadas às dietas de boa qualidade.

Portanto, a presente dissertação busca estudar o efeito de milho naturalmente contaminado com micotoxinas sobre a saúde de frangos de corte. O trabalho foi dividido em dois capítulos: Capítulo I que apresenta uma revisão bibliográfica sobre “Impacto de milho naturalmente contaminado sobre parâmetros produtivos, alterações morfológicas e resposta imunológica em animais de produção” e no Capítulo II um trabalho científico desenvolvido com o objetivo de avaliar “Dieta contendo milho naturalmente contaminado sobre parâmetros

produtivos, alterações morfológicas e resposta imunológica intestinal em frangos de corte”, através de análises macroscópicas, histológicas e imunoistoquímicas.

## Referências

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. v.16, p.497-516, 2003.

BOUHET, S.; OSWALD, I. P. The effects of mycotoxins, fungal contaminants, on the intestinal epithelial cell-derived innate immune response. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 108, p. 199-209, 2005.

CHOWDHURRY, S. R.; SMITH, T. K.; BOERMANS, H. J.; WOODWARD, B. Effects os feed-borne fusarium mycotoxins on hematology and immunology of laying hens. *Poultry Science*, v 84, p. 1841-1850, 2005.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECNOLOGY. Mycotoxins: Risk in plant, animal and human systems. Council for agricultural science and tecnology Task force n. 139, Ames, IA, 2003.

FARONI, L. R. D. Avaliação qualitativa e quantitativa dos grãos de milho e de soja armazenados em silo bag. Relatório Final - Universidade Federal de Viçosa, 2005.

GIRISH, C. K.; SMITH, T. K.; BOERMANS, H. J.; KUMAR, P. A.; GIRGIS, G. N. Effects of dietary *Fusarium* mycotoxins on intestinal lymphocyte subset populations, cell proliferation and histological changes in avian lymphoid organs. *Food and chemical toxicology*, v. 48, p. 3000-3007, 2010.

GRIMES, J. L.; KOCI, M. D.; STARK, C. R.; SMITH, D. P.; NIGHOT, P. K.; MIDDLETON, T. Biological effect of naturally occurring mycotoxins fed to poultz reared to 21 days of age. *International journal of poultry science*, v. 9, n. 9, p. 871-874, 2010.

HARVEY, R. B.; KUBENA, L. F.; HUFF, W. E.; ELISSADE, M. H.; PHILLIPS, T. D. Hematologic and immunologic toxicity of deoxinivalenol (DON)-contaminated diets to growing chickens. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, v. 46, p. 273-279, 1991.

LAMIC 2012, Resultados. Disponível em: <<http://www.lamic.ufsm.br/resultados.html>> Acesso em: 17/01/2012.

MACIOROWSKI, K.G.; HERRERA, P.; JONES, F.T.; PILLAI, S.D.; RICKE, S.C. Effects on poultry and livestock of feed contamination with bacteria and fungi. *Animal Feed Science and Technology*, v. 133, p. 109–136, 2007.

OSWALD, I. P.; MARIN, D. E.; BOUHET, S.; PINTON, P.; TARANU, I.; ACCENSI, F. Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals. Food additives and contaminants, v.22, n.4, p. 354-360, 2005.

QUIST, C. F.; BOUNOUS, D. I.; KILBURN, J. V.; NETTLES, V. F.; WYATT, R. D. The effect of dietary aflatoxin on wild turkey poults. Journal of wildlife diseases, v. 36, n. 3, p. 436-444, 2000.

SANTIN, E. Mould growth and mycotoxin production. In: DIAZ, D. The micotoxin blue book 1 ed. Nottingham, 2005, Cap. 5, p. 93-137.

## **CAPÍTULO I**

### **IMPACTO DE MILHO NATURALMENTE CONTAMINADO SOBRE PARÂMETROS PRODUTIVOS, ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO - REVISÃO DE LITERATURA**

# IMPACTO DE MILHO NATURALMENTE CONTAMINADO SOBRE PARÂMETROS PRODUTIVOS, ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO

*(Impact of naturally contaminated maize on productive parameters, morphological changes and immune response in farm animals)*

LEONARDO BOZZI MIGLINO

## RESUMO

O impacto das toxinas fúngicas sobre a produção e saúde animal já foi e ainda é bastante estudado. Sabe-se que rotineiramente os grãos de milho destinados à alimentação animal possuem algum grau de contaminação por micotoxinas e que sofrem alterações decorrentes da infestação fúngica. O que ainda não se sabe ao certo são quais os efeitos que essa interação entre as distintas micotoxinas e perdas nutricionais nos grãos naturalmente contaminados podem trazer para os animais. Sendo assim, a presente revisão tem como objetivo revisar aspectos relacionados à qualidade do milho e os efeitos das dietas que utilizam matérias-primas naturalmente contaminadas com micotoxinas sobre parâmetros produtivos, alterações morfológicas e resposta imunológica dos animais de produção.

**Palavras-chaves:** Micotoxina, desempenho zootécnico, morfologia hepática, linfócitos.

## ABSTRACT

The impact of fungi toxins on production and animal health has been and still is studied. Actually, a new point of view has been addressed in the study of mycotoxins, which is to study the impact of mycotoxin naturally contaminated grain on animal health. What remains unclear is exactly which effects this interaction between different mycotoxins and nutritional losses in naturally contaminated grains can bring to animals. Therefore, this review aims to clarify aspects related to grain quality and the effects of diets that use raw materials naturally contaminated with mycotoxins on the animals health and performance.

**Key-words:** Mycotoxins, production parameters, liver morphology, lymphocyte.



## INTRODUÇÃO

O crescimento da produção animal demanda cada vez mais incremento na produção de grãos, de maneira que os cereais são fatores que interferem diretamente sobre os custos de produção. As matérias primas utilizadas na alimentação são responsáveis por cerca de 60 a 80% destes custos (BELLAYER *et al.*, 2005). O milho é o grão utilizado em maior quantidade nas formulações devido a suas qualidades nutricionais, compondo aproximadamente 65% da energia metabolizável das rações (CARVALHO *et al.*, 2004).

Devido à elevada qualidade nutricional, os grãos de milho, são extremamente vulneráveis a contaminação fúngica (DA SILVA, 2007). Esta contaminação pode ocorrer pré-colheita, por meio do desenvolvimento de esporos depositados nas espigas trazidos por insetos vetores e aerossóis, ou pós-colheita, quando as condições de estocagem favorecem a germinação de esporos que acompanham os grãos durante a colheita (WILKINSON *et al.*, 2003).

Na prática, se em algum momento ocorreu o desenvolvimento de fungos nos cereais e/ou rações, normalmente tal crescimento será responsável por perdas nutricionais. Isso pôde ser evidenciado por GRIMES *et al.*, (2010) que utilizou milho naturalmente contaminado com micotoxinas (aflatoxina - AF e deoxinivalenol - DON) e observou redução significativa da energia metabolizável aparente.

Porém, como os fungos atacam principalmente o gérmen dos grãos de milho todos os outros nutrientes também podem sofrer alterações. Estes fungos podem causar redução no conteúdo de carboidratos, proteínas e açúcares totais (BUIATE *et al.*, 2006).

Uma das preocupações da utilização de milho naturalmente contaminado é a presença concomitante de várias espécies fúngicas resultando em competição por

nutriente o que por sua vez pode gerar situações de estresse fazendo com que estes produzam suas toxinas, no intuito de limitar o crescimento de outras espécies.

Quando os fungos toxicogênicos se deparam com condições ambientais que lhes são desfavoráveis, estes produzem metabólitos tóxicos denominados micotoxinas. O consumo destas pode afetar diversos sistemas do animal causando diferentes alterações metabólicas. Um sistema bastante sensível as micotoxinas é o imunológico, ocasionando quadros imunossupressivos que resultam em decréscimo na resistência a doenças infecciosas em animais de produção, podendo resultar em maior transmissão de patógenos para humanos (OSWALD *et al.*, 2005).

Frente ao exposto, a presente revisão tem como objetivo elucidar aspectos relacionados à qualidade dos grãos milho e os efeitos das dietas que utilizam matérias-primas naturalmente contaminadas com micotoxinas sobre a resposta imunológica de animais de produção.

#### QUALIDADE DO MILHO, CRESCIMENTO FÚNGICO E PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS.

O grão de milho é formado por quatro principais estruturas anatômicas: endosperma, germe (embrião), pericarpo (casca) e ponta, as quais diferem em composição química e também na organização dentro do grão. No entanto, vários fatores podem influenciar nesta composição, como sua origem, variedade, processamento, presença de pragas, clima da região e solo (FERRARINI, 2004).

A qualidade nutricional desse grão é determinante para a redução dos custos de produção e formulação de rações com melhor qualidade. Sendo assim, estes são classificados de acordo com as normas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, ditadas pela Portaria nº 845, de 8 de novembro de 1976 (MAPA, 1976). O milho é classificado em Tipo 1 (constituído de milho seco, são, de

grão regulares e com umidade máxima de 14,5%; Tolerância – máximo de 1,5% de matérias estranhas, impurezas e fragmentos, 11% de grãos avariados, com máximo de 3% de grãos ardidos e brotados – porcentagem em peso), Tipo 2 (constituído de milho seco, são, de grão regulares e com umidade máxima de 14,5%; Tolerância – máximo de 2% de matérias estranhas, impurezas e fragmentos, 18% de grãos avariados, com máximo de 6% de grãos ardidos e brotados – porcentagem em peso) e Tipo 3 (constituído de milho seco, são, de grão regulares e com umidade máxima de 14,5%; Tolerância – máximo de 3% de matérias estranhas, impurezas e fragmentos, 27% de grãos avariados, com máximo de 10% de grãos ardidos e brotados – porcentagem em peso), e caso não se enquadre em nenhuma das categorias, é classificado como abaixo do padrão (milho que pelas suas características não se enquadra em nenhum dos tipos descritos, desde que se apresente em bom estado de conservação). Na TABELA 1 encontram-se os parâmetros de qualidade adotados pela maioria das empresas produtoras de rações para aves.

TABELA 1. Principais parâmetros e seus níveis de tolerância no grão de milho utilizado por empresas produtoras de rações.

PARÂMETROS	TOLERÂNCIA MÁXIMA
Umidade	14%
Impureza	1%
Ardidos + Brotados	6%
Quirera	2%
Carunchado	2%
Aflatoxina	20 µg/kg
Ocratoxina	20 µg/kg
Fumonisina	8 µg/kg
Toxina T-2	400 µg/kg
Zearalenona	500 µg/kg
Vomitoxina	2000 µg/kg

FONTE: MENEGAZZO *et al*, 2002.

De modo geral, características consideradas para garantir a qualidade estão relacionadas a propriedades físicas dos grãos, como por exemplo, densidade, índices de danos mecânicos, físicos e biológicos. FIGUEIREDO *et al.* (2009) verificaram em análises laboratoriais de diferentes frações do milho (grãos íntegros, imaturos, atacados por insetos e fungos) que estes possuem valores nutricionais distintos.

Os parâmetros de qualidade podem ser afetados por inúmeros fatores e o milho é um ingrediente vulnerável a alterações durante todas as etapas da cadeia produtiva (desenvolvimento, maturação, transporte, colheita, secagem, armazenamento). Essas alterações estão relacionadas à contaminação dos grãos por diversos microorganismos (principalmente fungos), o que pode resultar em perdas no desempenho animal e, conseqüentemente, na lucratividade da produção.

A contaminação pode ser influenciada por algumas práticas comuns na produção agrícola, como por exemplo, a antecipação da colheita pode reduzir a ocorrência de infestação dos grãos por insetos e fungos, e conseqüentemente a produção de micotoxinas (LÁZZARI, 1997). Ao contrário, uma colheita tardia favorece a ocorrência de grãos ardidos (com proliferação fúngica) e atacados por insetos, reduzindo os teores de umidade e comprometendo o grão que será armazenado (RODRIGUES, 2009).

Frequentemente colhe-se o milho com alto teor de umidade, sendo necessária secagem até atingir o nível adequado, tornando seu armazenamento mais seguro (SANTIN *et al.*, 2001). Esta prática diminui artificialmente a umidade dos grãos até o alcance de um limite adequado, sem o comprometimento das suas propriedades naturais. Sua conservação com umidade de 12% ou abaixo é uma medida de controle contra o crescimento fúngico, prática considerada simples de ser

aplicada na conservação de cereais. Entretanto manter essa condição de umidade não é muito fácil, considerando a influência da atividade de água ( $A_w$ ) neste processo (SANTIN, 2001).

A  $A_w$  é descrita como sendo a razão entre a pressão de vapor da água do grão e a pressão de vapor da água pura sobre uma mesma temperatura e pressão, enquanto que o equilíbrio da umidade relativa é equivalente a  $A_w$  expressa em porcentagem. Sendo assim para certa umidade, os diferentes grãos vão possuir níveis variados de  $A_w$ , com conseqüente diferença no nível e tipo de crescimento fúngico. A passagem de água do grão para a forma de vapor é estimulada pelo aumento de temperatura, conseqüentemente a  $A_w$  e o crescimento fúngico, vão variar conforme a temperatura muda. (SANTIN, 2005).

Segundo MACIOROWSKI *et al.* (2007), as rações podem conter uma microflora diversa adquirida de múltiplas fontes ambientais. Tais microorganismos diminuem o valor nutricional do milho por meio de danos físicos, que proporcionam maior superfície de contato com o substrato, acelerando o desenvolvimento destes e levando a produção de toxinas prejudiciais à saúde animal.

Segundo SANTIN (2005), os fungos responsáveis pela deterioração da qualidade do grão podem ser classificados em fungos que requerem altos teores de umidade (20-21%) como *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* e fungos que necessitam de menores teores de umidade (13-18%) como *Aspergillus* e *Penicillium*. Algumas cepas de fungos são capazes de produzir mais de um tipo de micotoxina e também uma única micotoxina pode ser produzida por mais de uma espécie fúngica (DEVEGOWDA e MURTHY, 2005). Os principais gêneros presentes nos grãos destinados à alimentação animal e humana são: *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* spp (SWEENEY e DOBSON, 1998).

A característica física da massa de grãos é decisiva para a maior ou menor velocidade de desenvolvimento fúngico, isso porque grãos quebrados e infestados por insetos são alvo fácil, aumentando a superfície de contato entre o substrato e os microorganismos (CHRISTENSEN e KAUFMANN, 1969). Ainda, danos ao tegumento provocam a produção de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) e água (H<sub>2</sub>O) decorrente da respiração dos grãos, contribuindo para o aumento do teor de umidade, que, por sua vez, aumenta a respiração e a temperatura, facilitando a multiplicação fúngica (SANTOS, 2006).

Os fungos são seres vivos, por isso necessitam de alimento para assegurar seu desenvolvimento, sendo as rações, grãos e matérias-primas em geral, fontes úteis de nutrientes. A colonização do milho por fungos causa redução de matéria seca, em virtude da utilização das reservas de carboidratos, proteínas, lipídios e vitaminas. Uma das consequências é a redução do conteúdo de óleo dos grãos, implicando na redução de sua energia metabolizável, pois estes microorganismos produzem enzimas, as lipases, que atuam na oxidação dos lipídios (FARONI, 2005).

A presença de fungos não necessariamente está relacionada à presença de micotoxinas, visto que estas podem ficar nos alimentos mesmo após o desaparecimento fúngico. Segundo KRABBE (1995), níveis elevados de micotoxinas podem não representar uma alta atividade microbiológica.

As micotoxinas são metabólitos secundários estruturalmente diversos, de baixo peso molecular e não essenciais para o crescimento fúngico, sendo então, produzidas esporadicamente quando os mesmos se encontram em situações de estresse, podendo contaminar grande variedade de alimentos consumidos por animais e humanos (CHOWDHURY *et al.*, 2005; BOUHET e OSWALD, 2005; OSWALD *et al.*, 2005; LEVKUT *et al.*, 2011).

Geralmente a produção de micotoxinas pelos fungos está associada a condições de alterações de temperatura, umidade, aeração e a presença de agentes agressivos (SANTIN, 2005). As micotoxinas afetam gravemente funções vitais dos animais domésticos, prejudicando seu desempenho e elevando custos de produção e abate (SANTIN, 2001). Na TABELA 2 encontram-se as principais micotoxinas, os fungos que as produzem e suas propriedades tóxicas.

TABELA 2. Micotoxinas, agentes fungicos que as produzem e suas propriedades tóxicas em animais domésticos.

MICOTOXINA	FUNGO	TOXICIDADE
Aflatoxina (B1, B2, G1 e G2)	<i>Aspergillus</i> spp ( <i>A. flavus</i> e <i>parasiticus</i> )	Hepatotóxica, carcinogênica, teratogênica
Zearalenona	<i>Fusarium</i> spp ( <i>F. graminearum</i> , <i>culmorum</i> e <i>sacchari</i> )	Estrogênica, infertilidade, útero prolapsado, menor produção de leite
Tricotecenos (T2, DON, DAS)	<i>Fusarium</i> spp, <i>Trichoderma</i> spp e <i>Cephalosporium</i> spp	Náusea, recusa alimentar, irritação de mucosas, neurotóxica
Fumonisinás	<i>Fusarium</i> spp ( <i>F. verticillioide</i> s e <i>proliferatum</i> )	Hepatotóxica, nefrotóxica edema pulmonar (suínos) leucoencefalomalacia (eqüinos) hepatocarcinoma (ratos)
Ocratoxina A	<i>Aspergillus</i> spp e <i>Penicillium</i> spp	Nefrotóxica, carcinogênica, teratogênica, neurotóxica, imunotóxica

Adaptado de MACIOROWSKI *et al.*, 2007.

#### EFEITO DO MILHO NATURALMENTE CONTAMINADO SOBRE A PRODUÇÃO E SAÚDE ANIMAL COMPARADO AO USO DE TOXINA PURIFICADA.

Corriqueiramente, os grãos de milho utilizados na alimentação animal e/ou humana podem estar contaminados com uma grande variedade de fungos e/ou micotoxinas ao mesmo tempo (SPEIJERS e SPEIJERS, 2004). A presença destes metabólitos combinados pode ter efeitos mais tóxicos do que quando se utilizam doses equivalentes destas toxinas purificadas (HARVEY *et al.*, 1991). Segundo

WYATT (2005) a combinação destas toxinas pode gerar efeitos aditivos, antagônicos e sinérgicos nos animais os quais responderam de maneira distinta dependendo das toxinas existentes.

A maioria dos trabalhos publicados até hoje fazem uso de micotoxinas na sua forma purificada, atendo-se somente aos efeitos isolados de cada uma destas. Porém, a alimentação contendo milho naturalmente contaminado com múltiplas toxinas fúngicas é sem duvida mais condizente com as condições reais de campo (CHOWDHURY *et al.*, 2005; GIRISH *et al.*, 2010). Para CHAYTOR *et al.*, (2010) modelos de infecção natural são de extrema importância especialmente para entender os efeitos de níveis modestos de toxinfecção e o efeito da ação do fungo sobre a qualidade do cereal.

Pesquisas recentes também justificam trabalhos que fazem uso de milho naturalmente contaminado, pois foi observada a presença de formas químicas conjugadas das micotoxinas que não são capazes de serem detectadas pelos métodos convencionais de análises (BERTHILLER *et al.*, 2005), sendo assim, pode ocorrer uma menor estimativa da quantidade de toxinas e por consequência da toxicidade das rações.

Frequentemente, nas fábricas de rações é encontrado milho de qualidade duvidosa sendo utilizados para a alimentação animal, devido principalmente a grande demanda por parte das empresas e a falta de oferta dos mesmos de boa qualidade (RODRIGUES, 2009). Mas mesmo assim pesquisas avaliando os efeitos destes milhos sobre produção e saúde animal ainda são escassos. Esta escassez, provavelmente está relacionada à dificuldade de repetibilidade dos experimentos que utilizam cereais contaminados naturalmente, pois muitos dos autores não descrevem todas as características dos grãos usados.



Testando o efeito da adição de aditivos em rações formuladas com diferentes qualidades de grãos de milho, contaminados naturalmente com micotoxinas, para frangos de corte, GODOI *et al.* (2008), verificaram que o uso de milho de baixa qualidade (grãos ardidos e mofados) piora o desempenho zootécnico, aumenta a mortalidade, altera peso de fígado, além de prejudicar o rendimento e a qualidade de carcaça das aves. Nas análises nutricionais do milho de baixa qualidade (MBQ) comparado ao milho normal (MN) utilizado naquele estudo, os autores verificaram em MBQ maiores teores de proteína (MN - 7,80% x MBQ - 9,56%) e menores índices de extrato etéreo (MN - 3,43% x MBQ - 2,91%), comparado aos resultados das análises do MN. A avaliação micotoxicológica se restringiu apenas a presença de AF's, que foi encontrada nas rações finais em níveis de 62 e 88 ppb desta toxina. Em trabalho semelhante, porém fazendo uso de AF's purificadas (75 e 100 ppb), OGUZ *et al.*, (2000) obtiveram os mesmos resultados de parâmetros zootécnicos citados acima.

Entretanto, STRINGHINI *et al.*, (2000) utilizando grãos de milho com diferentes tipos de infestações (insetos ou fungos) em dietas para frangos de corte encontraram resultados diferentes. Naquele trabalho, as rações foram analisadas somente para AF's (B1 e G1) e a dosagem encontrada da soma destas duas AF variou de 15 a 80 ppb dependendo da inclusão e do tipo de infestação dos grãos. Estes autores não evidenciaram nenhuma alteração no que se referiu aos parâmetros de desempenho zootécnico. GIAMBRONE *et al.*, (1985) utilizaram rações inoculadas com 400 ppb de AF purificada não constatando alterações no que diz respeito aos parâmetros de produção.

Outros autores, como por exemplo, SWAMY *et al.* (2004), também utilizaram grãos de baixa qualidade, porém contaminados naturalmente com *Fusarium*

micotoxinas e verificaram durante a fase de crescimento (21 a 42 dias de idade) redução linear no consumo alimentar e ganho de peso de frangos de corte que receberam na dieta estes grãos. GIRGIS *et al.*, (2008) e GIRGIS *et al.*, (2010) também usaram grãos naturalmente contaminados com *Fusarium* micotoxinas, nas doses de 2,5 (ração inicial) e 3,8 (ração crescimento) µg/g e 5,3 (ração inicial) e 6,5 (ração crescimento) µg/g, respectivamente, porém não encontraram diferenças significativas no ganho de peso de frangos de corte alimentados com estes cereais. GRIMES *et al.*, (2010) em perus (doses: AF 97 ppb, DON 1,7 ppm e AF+DON 37 ppb + 0,9 ppm) e CHAYTOR *et al.*, (2010) em suínos (doses: AF 60 a 180 µg/Kg e DON 300 a 900 µg/Kg), estudaram o efeito de grãos naturalmente contaminados com AF e DON e em ambos os trabalhos foram evidenciadas pioras nos parâmetros produtivos.

Vale ressaltar que apenas um dos estudos acima citados (GODOI *et al.*, 2008), que trabalhou com grãos naturalmente contaminados, descreveu de forma bastante breve a qualidade nutricional do grão. Menos da metade dos trabalhos relatados aqui se preocuparam em analisar a quantidade de micotoxinas presentes nos cereais contaminados (GODOI *et al.*, 2008; GRIMES *et al.*, 2010; CHAYTOR *et al.*, 2010) antes de formular a ração, os outros só observaram os níveis nas rações.

Portanto, a discrepância dos resultados encontrados, pelos diversos autores, pode estar relacionada além de tempo de exposição à toxina, às diferenças de tolerância entre espécies e a idade e sexo dos indivíduos ao fato de haver associação de diferentes micotoxinas nos grãos utilizados ou então as diferenças nutricionais que o desenvolvimento fúngico possa ter causado nessas matérias-primas. Sendo assim, sugere-se que os trabalhos que optem por fazer uso de matérias-primas naturalmente contaminadas estabeleçam padrões mínimos de

análises sendo estas comuns a todos, buscando conhecer melhor as interações das varias micotoxinas/qualidade nutricional do cereal sobre a saúde e produção animal.

Da mesma forma que ocorre com os parâmetros de produção, lesões macroscópicas frequentemente encontradas utilizando toxinas purificadas, também são evidenciadas nos trabalhos que fizeram uso de grãos naturalmente contaminados. De acordo com DEL BIANCHI *et al.*, (2005), que utilizou toxinas purificadas, é observado grande acúmulo de micotoxinas, em especial AF's, nos órgãos envolvidos na biotransformação, como por exemplo, fígado e rins. Esta afirmação é condizente com os dados encontrados por GRIMES, *et al.*, (2010) que observaram aumento do peso de fígado de perus que receberam dietas naturalmente contaminadas com AF e DON, porém estes autores não puderam observar alterações de coloração e bordas que são frequentemente vistas em intoxicações com AF's purificadas (MIAZZO *et al.*, 2005; SANTIN *et al.*, 2003; RAUBER *et al.*, 2007). STRINGHINI *et al.*, (2000) discordam destes resultados, pois não evidenciaram alterações macroscópicas no fígado de aves alimentadas com grãos de milho naturalmente contaminados.

Em relação a parâmetros imunológicos, também é possível encontrar correlações das alterações observadas em animais que receberam toxina purificada ou grãos naturalmente contaminados. Utilizando cereais contaminados naturalmente com *Fusarium* toxinas, SWAMY *et al.*, (2002) detectou redução linear e quadrática de imunoglobulina - A (IgA) na bile de frangos de corte que receberam estes ingredientes. Estes mesmos autores em estudo mais recente, também utilizando grãos naturalmente contaminados com *Fusarium* toxinas na alimentação de frangos, perceberam redução na população de monócitos circulantes, decréscimo linear na porcentagem de linfócitos B e quadrático na porcentagem de linfócitos T, não sendo

evidenciada nenhuma alteração sobre imunoglobulinas e reação de hipersensibilidade tardia (RHT) (SWAMY *et al.*, 2004).

CHOWDHURY *et al.*, (2005) alimentando poedeiras com milho e trigo naturalmente contaminados com *Fusarium* toxinas avaliaram parâmetros imunológicos e constataram redução na contagem de células brancas, linfócitos B, linfócitos T CD4+ e CD8+ no sangue, decréscimo de IgA na bile, aumento 24 horas pós desafio na RHT não sendo encontrado nenhum efeito sobre a produção de anticorpos. Resultados semelhantes também são encontrados em outras espécies, como por exemplo, em perus onde a alimentação contendo grãos naturalmente contaminados com *Fusarium* toxinas reduziu a contagem de linfócitos totais assim como a quantidade de imunoglobulina – G (IgG) contra *sheep red blood cells* (SRBC) e também a diminuiu a RHT, porém aumentou a porcentagem de linfócitos T CD4+ no sangue (GIRISH *et al.*, 2008). Também trabalhando com perus e grãos naturalmente contaminados, mas com AF's e DON, GRIMES *et al.*, (2010), não encontraram diferença significativa na produção de anticorpos contra SRBC. Apesar dos resultados serem bastante semelhantes, a repetibilidade destes trabalhos é bastante complicada devido à falta da apresentação de dados relacionados principalmente as características dos grãos naturalmente contaminados. Nenhum dos trabalhos apresentou resultados a respeito da qualidade nutricional dos grãos e apenas um deles realizou análises micotoxicológicas destes cereais antes da formulação das rações.

## EFEITO DOS GRÃOS DE MILHO NATURALMENTE CONTAMINADOS SOBRE A RESPOSTA IMUNOLÓGICA DO TRATO GASTROINTESTINAL DOS ANIMAIS DE PRODUÇÃO

Micotoxinas também podem causar efeitos sobre o epitélio intestinal, visto que este é a primeira barreira de prevenção contra a entrada de antígenos estranhos, incluindo proteínas da alimentação, toxinas naturais, flora comensal e patógenos, para os tecidos subjacentes (BOUHET e OSWALD, 2005). Para WESTENDORF *et al.*, (2010) o desafio central do sistema imunológico intestinal é balancear os mecanismos de defesa com os de tolerância.

As células do epitélio intestinal (CEI) têm papel fundamental na resposta imune local, pois possuem mecanismos intrínsecos de defesas como secreção de muco e peptídeos antimicrobianos, e expressam citocinas que são cruciais para o recrutamento e ativação de células do sistema imune (BOUHET e OSWALD, 2005). Composto este conjunto de células do epitélio intestinal, encontram-se as chamadas células apresentadoras de antígenos, sendo as células dendríticas o grupo mais efetivo (MURPHY *et al.*, 2010).

Interações entre células apresentadoras de antígenos com os linfócitos T e B são responsáveis pelo desenvolvimento de resposta imune. Esta envolve proliferação celular (linfócitos T), aumento da síntese protéica (incluindo síntese de imunoglobulinas por linfócitos B e síntese das proteínas de fase aguda no fígado) e produção dos mediadores de inflamação (SURAI e DVORSKA, 2005).

Uma pequena parcela dos trabalhos que utilizam grãos naturalmente contaminados procura entender do ponto vista imunológico a interação que ocorre entre as micotoxinas e suas ações sobre população de células linfóides no sangue

ou mucosas, expressão de mediadores inflamatórios e outros aspectos relacionados ao sistema imunológico dos animais.

Utilizando grãos naturalmente contaminados com zearalenona (ZEA) e DON, LEVKUT *et al.*, (2011) alimentado frangos de corte por 28 dias, observou no sangue periférico redução da atividade fagocítica e da população de linfócitos T CD3+, e na mucosa do duodeno foi observado decréscimo dos linfócitos que expressam MHCII+. GIRGIS *et al.*, (2010) utilizaram na dieta de frangos corte grãos naturalmente contaminados por *Fusarium* toxinas e realizaram dois desafios com *Eimeria maxima* nestes animais. Estes mesmos autores observaram redução nas populações de linfócitos T CD4+ e CD8+ na mucosa do jejuno daquelas aves que receberam ingredientes naturalmente contaminados na dieta comparada as do grupo controle.

Em perus que receberam na formulação de suas dietas, durante 21 dias, grãos naturalmente contaminados com *Fusarium* toxinas, foi observado aos 14 dias de exposição aumento na porcentagem de células B IgM+ no íleo, mas nenhum efeito foi constatado quando se referiu a linfócitos T CD4+ ou CD8+. Já aos 21 dias de exposição não foram evidenciados efeitos sobre células T CD4+ e B IgM+, porém houve drástica redução na porcentagem de linfócitos T CD8+ na tonsila cecal. Como esses linfócitos T CD8+ citotóxicos estão intimamente envolvidos no desenvolvimento de resistência contra patógenos intracelulares, os autores sugerem que a redução observada por eles pode tornar os perus mais susceptíveis a doenças infecciosas o que por sua vez pode também aumentar os casos de transmissão de agentes patogênicos para os humanos (GIRISH *et al.*, 2010).

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O impacto de ingredientes da má qualidade, contaminados com micotoxinas, sobre produção animal tem sido bastante pesquisado, pois estas toxinas são capazes de provocar um grande comprometimento do sistema imunológico, acarretando maior susceptibilidade a doenças, aumento na transmissão de patógenos para humanos e trazendo graves perdas econômicas na produção animal.

Através dos dados compilados nesta revisão é notável que grãos naturalmente contaminados tem relevante impacto sobre os animais, sendo este muitas vezes semelhantes aos prejuízos causados por intoxicações com micotoxinas purificadas, porém em níveis mais baixos. Desta forma é extremamente importante que os experimentos que optem por trabalhar com estas matérias primas realizem e apresentem análises bromatológicas e micotoxicológicas para que assim se tenha maior repetibilidade dos resultados, principalmente no que se refere a correlacionar com problemas de campo.

## REFERÊNCIAS

- BELLAVER, C.; LUDKE, J. V.; LIMA, G. J. M. M. Qualidade e padrões de ingredientes para rações. São Paulo: Global Feed & Food Congress, 2005.
- BERTHILLER, F.; DALL'ASTA, C.; SCHUHMACHER, R.; LEMMES, M.; ADAM, G.; KRSKA, R. Masked Mycotoxins: Determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem Mass spectrometry, *Journal of Agricultural and food chemistry*, v. 53, p. 3421-3425, 2005.
- BOUHET, S.; OSWALD, I. P. The effects of mycotoxins, fungal contaminants, on the intestinal epithelial cell-derived innate immune response. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 108, p. 199-209, 2005.
- BUIATE, E. A. S. et al. Relação de híbridos de milho e levantamento dos principais fungos associados ao complexo de patógenos causadores de "grão ardido" em Minas Gerais. In: XXVI Congresso Nacional de milho e sorgo, Belo Horizonte, 2006.
- CARVALHO, D. C. O. Composição química e energética de amostras de milho submetidas a diferentes temperaturas de secagem e períodos de armazenamento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, n.2, p.358-364, 2004.
- CHAYTOR, A. C.; SEE, M. T.; HANSEN, J. A.; SOUZA, A. L. P.; MIDDLETON, T. F.; KIM, S. W. Effects of cronic exposure of diets with low levels of aflatoxin and deoxynivalenol on growth and immune status of pigs. *Journal of animal science*, v. s/n, p. 1-42, 2010.
- CHOWDHURRY, S. R.; SMITH, T. K.; BOERMANS, H. J.; WOODWARD, B. Effects os feed-borne fusarium mycotoxins on hematology and immunology of laying hens. *Poultry Science*, v 84, p. 1841-1850, 2005.
- CHRISTENSEN, C. M.; KAUFMANN, H. H. Grain storage - The role of fungi in quality loss. *Minnesota Archive Editions*, p. 4, 23, 24; 1969.
- DA SILVA, M. Avaliação da presença de fungos e micotoxinas na tecnologia de pós-colheita do milho. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2007. 120 p. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia - Universidade Estadual de Londrina, 2007.
- DAVEGOWDA, G.; MURTHY, T. N. K. Mycotoxins: Their effects in poultry and some practical solutions. In: DIAZ, D. The micotoxin blue book 1 ed. Nottingham, 2005, Cap. 2., p. 25-56.
- DEL BIANCHI, M.; OLIVEIRA, C. A. F.; ALBUQUERQUE, R.; GUERRA, J. L.; CORREA, B. Effects of prolonged oral administration of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in broiler chickens. *Poultry science*, v.84, p.1835-1840, 2005.
- FARONI, L. R. D. Avaliação qualitativa e quantitativa dos grãos de milho e de soja armazenados em silo bag. Relatório Final - Universidade Federal de Viçosa, 2005.



FERRARINI, H. Determinação de teores nutricionais do milho por espectroscopia no infravermelho e calibração multivariada. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2004. 125p. Dissertação de mestrado em Química - Universidade Federal do Paraná, 2004.

FIGUEIREDO, A. N. et al. Relação entre densidade e a energia metabolizável aparente (EMAn) das diferentes frações do milho nas dietas para frangos de corte. 2009. Disponível em: <<http://pt.engormix.com/MA-avicultura/nutricao/artigos.htm>> Acesso em: 12/12/2011.

GIAMBRONE, J. J.; DIENER, U. L.; DAVIS, N. D.; PANANGALA, V. S.; HOERR, F. J. Effects of purified aflatoxin on broiler chickens. Poultry Science, v. 64, p. 852-858, 1985.

GIRGIS, G. N.; SHARIF, S.; BARTA, J. R.; BOERMANS, H. J.; SMITH, T. K. Immunomodulatory effects of feed-borne *Fusarium* mycotoxins in chickens infected with Coccidia. Experimental biology and medicine, v. 233, p. 1411-1420, 2008.

GIRGIS, G. N.; BARTA, J. R.; GIRISH, C. K.; KARROW, N. A.; BOERMANS, H. J.; SMITH, T. K. Effects of feed-borne *Fusarium* mycotoxins and na organic mycotoxin adsorbent on immune cell dynamics in the jejunum of chickens infected with *Eimeria maxima*. Veterinary immunology and immunopathology, v. 138, p. 218-223, 2010.

GIRISH, C. K.; SMITH, T. K.; BOERMANS, H. J.; KARROW, N. A. Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on Performance, hematology, metabolism, and immunocompetence of turkeys. Poultry science, v. 87, p. 421-432, 2008.

GIRISH, C. K.; SMITH, T. K.; BOERMANS, H. J.; KUMAR, P. A.; GIRGIS, G. N. Effects of dietary *Fusarium* mycotoxins on intestinal lymphocyte subset populations, cell proliferation and histological changes in avian lymphoid organs. Food and chemical toxicology, v. 48, p. 3000-3007, 2010.

GRIMES, J. L.; KOCL, M. D.; STARK, C. R.; SMITH, D. P.; NIGHOT, P. K.; MIDDLETON, T. Biological effect of naturally occurring mycotoxins fed to poults reared to 21 days of age. International journal of poultry science, v. 9, n. 9, p. 871-874, 2010.

GODOI, M. J. S.; ALBINO, L. F. T.; ROSTAGNO, H. S.; GOMES, P. C.; BARRETO, S. L. T.; JUNIOR, J. G. V. Utilização de aditivos em rações formuladas com milho normal e de baixa qualidade para frangos de corte. Rev. Bras. Zootecnia, v.37, n.6, p.1005-1011, 2008.

HARVEY, R. B.; KUBENA, L. F.; HUFF, W. E.; ELISSADE, M. H.; PHILLIPS, T. D. Hematologic and immunologic toxicity of deoxinivalenol (DON)-contaminated diets to growing chickens. Bulletin of environmental contamination and toxicology, v. 46, p. 273-279, 1991.

KRABBE, E. L. Efeito do desenvolvimento fúngico em grãos de milho durante o armazenamento e do uso de ácido propiônico sobre as características nutricionais e o desempenho de frangos de corte. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 176p. Dissertação de mestrado em Zootecnia - UFRGS, 1995.

LAZZARI, F. A. Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações. 2ed., Curitiba, v.1, 134 p., 1997.

LEVKUT, M.; REVAJOVA, V.; SLAMINKOVA, Z.; LEVKUTOVA, M.; BORUTOVA, R.; GRESAKOVA, L.; LENG, L. Lymphocyte subpopulations in blood and duodenal epithelium of broilers fed diets contaminated with deoxynivalenol and zearalenone. *Animal feed science and technology*, v. 165, p. 210-217, 2011.

MACIOROWSKI, K.G.; HERRERA, P.; JONES, F.T.; PILLAI, S.D.; RICKE, S.C. Effects on poultry and livestock of feed contamination with bacteria and fungi. *Animal Feed Science and Technology*, v. 133, p. 109–136, 2007.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº. 845, de Novembro de 1976. 1976.

MENEGAZZO, R.; GIACOMINI, V.; TRICHEZ, M. A. Amostragem e monitoramento de micotoxinas em matérias primas para rações. In: \*Seminário Nacional de Milho Safrinha\*, p.161-171. Londrina, 25 a 28 de junho de 2002.

MAZZO, R.; PERALTA, M. F.; MAGNOLI, C.; SALVANO, M.; FERRERO, S.; CHIACCHIERA, S. M.; CARVALHO E. C. Q.; ROSA, C. A. R.; DALCERO, A. Efficacy of sodium bentonite as a detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin and fumonisin. *Poultry science*, v. 84, p. 1-8, 2005.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. Conceitos básicos em imunologia. In: MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. *Imunobiologia de Janeway*. 7 ed. Porto Alegre : Artmed, 2010, Cap 1, p. 1-39.

OGUZ, H.; KORTOGLU, V.; COSKUN, B. Preventive efficacy of clinoptilolite in Broilers during chronic aflatoxin (50 and 100ppb) exposure. *Research in veterinary science*, v. 69, p. 197-201, 2000.

OSWALD, I. P.; MARIN, D. E.; BOUHET, S.; PINTON, P.; TARANU, I.; ACCENSI, F. Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals. *Food additives and contaminants*, v.22, n.4, p. 354-360, 2005.

RAUBER, R. H.; DILKIN, P.; GIACOMINI, L. Z.; ARAÚJO DE ALMEIDA, C. A.; MALLMANN, C. A. Performance of turkey poult fed different doses of aflatoxin in the diet. *Poultry science*, v. 86, p. 1620-1624, 2007.

RODRIGUES, S. I. F. C. Avaliação da qualidade do milho e predição da energia metabolizável para uso em avicultura. Universidade de Brasília, 2009. 120p. Tese de Doutorado em Ciência Animais - Universidade de Brasília, 2009.

SANTIN, E. et al. Efeitos de produto de exclusão competitiva na prevenção dos efeitos tóxicos da ocratoxina A em frangos. Revista Brasileira de Ciência Avícola, v.3, n.2, Campinas, 2001.

SANTIN, E. Mould growth and mycotoxin production. In: DIAZ, D. The micotoxin blue book 1 ed. Nottingham, 2005, Cap. 5, p. 93-137.

SANTIN, E.; PAULILLO, A. C.; MAIORKA, A.; NAKAGHI, L. S. O.; MACARI, M.; SILVA, A. V. F.; ALESSI, A. C. Evaluation of the efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. In international journal of poultry science, v. 2, n. 5, p. 341-344, 2003.

SANTIN, E. Aspectos clínicos, patológicos, imunitários e zootécnicos em frangos de corte inoculados experimentalmente com aflatoxina e/ou ocratoxinas e vacinados contra a doença de Newcastle. Emprego de *Saccharomyces cerevisiae* como adsorvente de micotoxinas. Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2003, p.120. Tese de doutorado em ciências veterinárias – UNESP, 2003.

SANTOS, J. P. Controle de Pragas Durante o Armazenamento de Milho. In: EMBRAPA CNPSA, Circular Técnica nº 84, Sete Lagoas - MG, 2006.

SPEIJERS, G. J. A.; SPEIJERS, M. H. M. Combined toxic effects of mycotoxins. Toxicology Letters, v. 153, p. 91-98, 2004.

SURAI, P. F.; DVORSKA, J. E. Effects of mycotoxin on antioxidant status and immunity. In: DIAZ, D. The micotoxin blue book 1 ed. Nottingham, 2005, Cap. 5, p. 93-137.

STRINGHINI, J. H.; MOGYCA, N. S.; ANDRADE, M. A.; ORSINE, G. F.; CAFÉ, M. B.; BORGES, S.A. Efeito da qualidade do milho no desempenho de frangos de corte. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 29, n. 1, p. 191-198, 2000.

SWAMY, H. V. L. N.; SMITH, T. K.; COTTER, P. F.; BOERMANST, H. J.; SEFTON, A. E. Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxin on production and metabolism in broilers. Poultry Science, v. 81, p. 966-975, 2002.

SWAMY, H. V. L. N.; SMITH, T. K.; KARROW, N. A.; BOERMANST, H. J. Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxin on growth and immunological parameters of broiler chickens. Poultry Science, v. 83, p. 533-543, 2004.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. International journal food microbiology, v.43, p. 141-158, 1998.

WESTENDORF, A. M.; FLEISSNER, D.; HANSEN, W.; BUER, J. T cells, dendritic cells and epithelial cells in intestinal homeostasis. International journal of medical microbiology, v. 300, p. 11-18, 2010.

WILKINSON, J.; ROOD, D.; MINIOR, D.; GUILLARD, K.; DARRE, M.; SILBART, L. K. Immune response to a mucosally administered aflatoxin B<sub>1</sub> vaccine. Poultry Science v.82, p.1565-1572, 2003.

WYATT, R. D. Mycotoxin interactions. In: DIAZ, D. The mycotoxin blue book 1 ed. Nottingham, 2005, Cap.12, p. 269-278.

## **CAPÍTULO II**

**DIETAS CONTENDO MILHO NATURALMENTE CONTAMINADO COM  
MICOTOXINAS SOBRE MORFOFISIOLOGIA HEPATICA E  
RESPOSTA IMUNOLÓGICA INTESTINAL EM FRANGOS DE CORTE**

## DIETAS CONTENDO MILHO NATURALMENTE CONTAMINADO COM MICOTOXINAS SOBRE MORFOFISIOLOGIA HEPATICA E RESPOSTA IMUNOLÓGICA INTESTINAL EM FRANGOS DE CORTE

*(Mycotoxin naturally contaminated corn diets on liver morphophysiology and intestinal immune response in broilers)*

LEONARDO BOZZI MIGLINO

### RESUMO

A utilização de grãos naturalmente contaminados com fungos e micotoxinas em ração animal é bastante frequente em várias regiões do mundo. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de dietas formuladas com milho naturalmente contaminado com micotoxinas sobre o ganho de peso, alterações morfológicas e populações de células CD4+ e CD8+ no intestino de frangos de corte. Foram utilizados dois grupos experimentais: T1, com dieta controle basal; T2, dieta basal com 30% de inclusão de milho milho naturalmente contaminado com 2905 ppb de aflatoxinas e 125 ppb de fumonisinas. As aves que receberam os grãos naturalmente contaminados apresentaram redução no ganho de peso e alterações no fígado e rins. A inclusão de milho contaminado com micotoxina diminuiu significativamente células CD4+ e CD8+ na mucosa intestinal das aves comparado com aves que receberam milho de boa qualidade. Estes resultados sugerem comprometimento do sistema imunológico de mucosa o que pode também acarretar em maior susceptibilidade a doenças infecciosas.

**Palavras-chave:** Aflatoxina, fumonisina, imunossupressão, imunidade celular, CD4+, CD8+.

### ABSTRACT

The grains produced worldwide are often contaminated with fungi and mycotoxins. The aim of this study was to evaluate the effect of diets containing mycotoxin naturally contaminated maize on populations of CD4+ and CD8+ cells in the intestine of broilers. Broilers were divided in two treatments: T1, basal diet (control), T2, basal diet with 30% of mycotoxin naturally contaminated maize with 2905 ppb aflatoxin and 125 ppb fumonisin. Birds that received naturally contaminated maize showed liver and kidneys lesions. The inclusion of aflatoxin contaminated maize significantly reduced CD4+ and CD8+ cells count in the intestine. These results demonstrated that mycotoxins naturally contaminated grains impaired mucosa immune system which can also result in increased susceptibility to infections.

**Keywords:** contaminated food, aflatoxin, immunosuppression, intestinal lymphocytes, cellular immunity.

## INTRODUÇÃO

A contaminação de milho com fungos e micotoxinas tem resultado em perdas econômicas para agroindústria de todo o mundo. Em animais de produção os impactos destas toxinas causam decréscimo no ganho de peso, eficiência alimentar, na produção de carne e ovos e aumento da incidência de doenças devido à supressão do sistema imunológico (CAST, 2003) podendo acarretar ainda sérios problemas relacionados à saúde pública.

Micotoxicose é a doença relacionada ao consumo de alimentos contaminados por micotoxinas (BENNETE e KLICH, 2003). A severidade desta enfermidade depende do tipo e concentração da micotoxina, da duração da exposição, gênero, idade e estado de saúde dos animais ou seres humanos (CHOWDHURY *et al.*, 2005).

Na prática, o milho utilizado na alimentação animal são frequentemente contaminados com mais de uma micotoxina (SPEIJERS e SPEIJERS, 2004). Segundo HARVEY *et al.*, (1991) essa interação entre toxinas nos grãos contaminados pode trazer efeitos mais tóxicos do que quando doses equivalentes destas toxinas purificadas são adicionadas às dietas. Além disso, o crescimento fúngico pode ainda provocar perdas nutricionais nos grãos e também dessa forma afetar a susceptibilidade dos animais aos diferentes níveis de micotoxinas (FIGUEIREDO *et al.*, 2009).

Grande parte dos estudos relatando prejuízos causados por micotoxinas faz uso destas toxinas purificadas, entretanto, a alimentação contendo grãos naturalmente contaminados com múltiplas micotoxinas é mais refletiva das

condições reais da situação das dietas que estão presentes nas criações (CHOWDHURY *et al.*, 2005; GIRISH *et al.*, 2010).

A importância do desenvolvimento de pesquisas utilizando grãos naturalmente contaminados se justifica ainda por recentes pesquisas que indicaram a presença de formas químicas conjugadas das micotoxinas, as quais escapam dos métodos convencionais de análises (BERTHILLER *et al.*, 2005), resultando em menor estimativa da quantidade de toxina e consequentemente toxicidade da ração.

Uma das principais micotoxinas que pode contaminar o milho são as aflatoxinas (AF). Sabe-se que seu efeito mais negativo está relacionado ao comprometimento imunológico aumentando a susceptibilidade destes às enfermidades infecciosas (CHAYTOR *et al.*, 2010).

Os efeitos imunossupressores das AF's estão relacionados à inibição da síntese protéica e são em partes mediados pela redução da capacidade fagocítica, decréscimo da expressão de receptores CD 14 (receptor de lipopolissacarídeos-LPS) sobre macrófagos e redução da produção de óxido nítrico (MOON e PYO, 2000). Ainda, de acordo com MEISSONNIER *et al.*, (2008), o comprometimento da resposta imune celular pode ser devido aos efeitos inibitórios de citocinas inflamatórias (principalmente IL-6) que regulam a apresentação de antígenos e resposta imune antígeno-específica.

O efeito de micotoxinas sobre a resposta imunológica de mucosa do trato gastrointestinal deve ser considerada ainda como algo muito importante, pois este sistema tem papel essencial na imunidade, sendo considerada uma barreira física seletiva, que pode ser afetada pelo consumo de alimentos contaminados com micotoxinas (YEGANI e KORVER, 2008). Alguns estudos tem demonstrado este



efeito com fumonisinas em suínos (BOUHET e OSWALD, 2005), porém é muito limitado o estudo do efeito destas micotoxinas sobre a mucosa intestinal de aves.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo é avaliar o efeito de dietas formuladas com milho naturalmente contaminado com micotoxina, com predominância de aflatoxina e fumonisina, sobre o morfo fisiologia de fígado e resposta imunológica do trato gastrointestinal de frangos de corte.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizados 40 frangos de corte da linhagem Cobb® 500, machos de um dia de idade que após serem individualmente pesados foram distribuídos proporcionalmente em relação ao peso corporal entre dois tratamentos: Tratamento 1 (T1) – Ração basal controle e Tratamento 2 (T2) – Ração basal, com 30% de milho naturalmente contaminado com micotoxinas.

Os animais foram alojados em salas separadas e idênticas, localizadas lado a lado, com pressão negativa, limpas e desinfetadas em cama de maravalha utilizada foi previamente esterilizada em autoclave a 121° C por 15 minutos, para redução do estímulo antigênico nos frangos por microrganismos.

As aves foram mantidas em temperatura ideal de conforto dependendo da fase de vida e receberam no alojamento vacina comercial Coccivac D® (MSD Saúde Animal - Intervet Schering-plough Animal Health - Cramlington, Inglaterra) aplicada individualmente por meio de gota ocular (0,015mL;ave). A iluminação foi contínua e água e o alimento foram fornecidos à vontade e consistiu em ração à base de milho e soja formulada conforme TABELA 1. Foi utilizado ração pré-inicial de 1 a 7 dias, ração inicial de 8 a 21 dias e ração crescimento de 22 a 35 dias.

TABELA 1. Composição das dietas experimentais.

	<b>Pré Inicial T1</b>	<b>Inicial T1</b>	<b>Crescimento T1</b>	<b>Pré Inicial T2</b>	<b>Inicial T2</b>	<b>Crescimento T2</b>
Ingredientes	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Milho	49,59	52,79	54,76	19,58	22,79	24,76
Milho naturalmente contaminado	0,0	0,0	0,0	30,00	30,00	30,00
Farelo de Soja	38,15	34,26	31,97	38,15	34,26	31,97
Óleo de Soja	4,24	5,24	6,06	4,24	5,24	6,06
Fosfato Bicálcico	1,87	1,53	1,30	1,87	1,53	1,30
Calcário	0,91	0,97	0,89	0,91	0,97	0,89
Sal comum	0,45	0,43	0,41	0,45	0,43	0,41
Metionina	0,34	0,30	0,26	0,34	0,30	0,26
Lisina	0,31	0,30	0,26	0,31	0,30	0,26
Treonina	0,14	0,18	0,09	0,14	0,18	0,09
Premix <sup>1</sup>	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
TOTAL	100	100	100	100	100	100
<b>Nutrientes</b>						
EM (Mcal/Kg)	2960	3068	3150	2960	3051	3149
Proteína Bruta	22%	20,5%	19,5%	22%	20,5%	19,5%
Cálcio	0,92%	0,85%	0,76%	0,92%	0,85%	0,76%
Fósforo	0,47%	0,40%	0,35%	0,47%	0,43%	0,35%
Sódio	0,22%	0,21%	0,20%	0,22%	0,21%	0,20%
Lisina	1,32%	1,22%	1,13%	1,32%	1,22%	1,13%
Metionina	0,64%	0,58%	0,53%	0,64%	0,59%	0,52%
Met. + Cis.	0,93%	0,85%	0,79%	0,93%	0,87%	0,79%
Treonina	0,86%	0,84%	0,74%	0,86%	0,85%	0,74%
Matéria Mineral	3,17%	2,95%	2,82%	3,17%	2,95%	2,82%

<sup>1</sup> Vitamina A 262.500 UI/Kg; Vitamina D3 52.500 UI/Kg; Vitamina E 450 UI/Kg; Vitamina K3 50 mg/Kg; Vitamina B1 44 mg/Kg; Vitamina B2 150 mg/Kg; Vitamina B6 90 mg/Kg; Vitamina B12 360 mcg/Kg; Niacina 900 mg/Kg; Colina 9450 mg/Kg; Pantotenato de cálcio 300 mg/Kg; Ácido fólico 22,5 mg/Kg; Biotina 1,5 mg/Kg; Cálcio 230 a 240 g/Kg; Fósforo 68 g/Kg; Sódio 42 g/Kg; Ferro 3300 mg/Kg; Manganês 1900 mg/Kg; Zinco 1500 mg/Kg; Cobre 18 g/Kg.

As composições bromatológica e micotoxicológica dos diferentes grãos de milho utilizado neste estudo estão discriminadas na TABELA 2.

TABELA 2. Composição bromatológica e micotoxicológica dos grãos de milho utilizados nas formulações das dietas experimentais.

Componentes	Milho Normal	Milho Naturalmente Contaminado
	Bromatologia (%)	
Proteína Bruta	7,5	8,36
Umidade 105°C	12,01	18,18
Extrato Etéreo	3,65	3,49
Resíduo Mineral	1,09	1,15
Fibra Bruta	2,73	1,40
Calcio	0,04	0,03
Fósforo	0,26	0,25
	Micotoxicologia (µg/Kg)	
Aflatoxina B <sub>1</sub>	1	2595
Aflatoxina B <sub>2</sub>	ND*	175
Aflatoxina G <sub>1</sub>	ND	10
Aflatoxina G <sub>2</sub>	ND	125
Fumonisina B <sub>1</sub>	429	125
Fumonisina B <sub>2</sub>	145	ND
Diacetoxicirpenol (DAS)	ND	ND
T2	ND	ND
Ergosterol	3,9	1,6

\*ND = Não detectável

Com base nestes resultados foram formuladas as rações que foram analisadas para aflatoxina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>; fumonisina B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e atividade de água (Aw) (TABELA 3). As análises de micotoxinas foram realizadas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas triplo quadrupólo (LC-MS/MS) para aflatoxina em milho, zearalenona, fumonisinas e tricotecenos em milho e ração. Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (LC-FLD) para aflatoxina em ração e ocratoxina em milho e ração. A análise de água (AW) foi realizada pela metodologia do ponto de orvalho em espelho encapsulado.

TABELA 3. Concentrações de micotoxinas e atividade de água nas dietas experimentais.

Dietas	AFB <sub>1</sub> <sup>3</sup>	AFB <sub>2</sub>	Micotoxinas (µg / Kg)		FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	Aw
			AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>			
			Pré – Inicial				
T1 <sup>1</sup>	ND <sup>2</sup>	ND	ND	ND	846	318	0,728
T2	550	42	ND	ND	566	173	0,721
			Inicial				
T1	ND	ND	ND	ND	767	315	0,715
T2	549,5	44,5	ND	ND	670	225	0,712
			Crescimento				
T1	ND	ND	ND	ND	850	354	0,698
T2	490.5	37.15	11	ND	523	201	0.725

<sup>1</sup>T1 = dieta controle sem adição de milho naturalmente contaminado; T2 = dieta com inclusão de milho naturalmente contaminado.

<sup>2</sup>ND = Não detectável (limite de detecção: Aflatoxinas - 1 µg/Kg; Fumonisinas - 50 µg/Kg).

<sup>3</sup>AF = Aflatoxinas em suas formas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>; F = Fumonisinas em suas formas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>.

Semanalmente as aves foram pesadas individualmente e aos 07, 17 e 35 dias de idade, cinco animais de cada tratamento foram selecionados ao acaso e eutanasiados por deslocamento cervical para realização de necropsia e observação de aspectos dos diferentes órgãos (forma, coloração e volume). Os principais órgãos comprometidos por toxinfecções com aflatoxinas (fígado, rins, musculatura e intestino) receberam escores de lesão que variam de 0 (sem lesão) a 3 (lesão máxima) e estes foram multiplicados por fatores de severidade, sendo o mesmo procedimento aplicado para análise microscópica do fígado conforme TABELA 4 adaptado de GRENIER *et al.* (2011). Foi também realizado análise de escore de lesão para coccidiose de acordo com JOHNSON e REID (1970).

Aos 7, 17 e 35 dias, de cada tratamento foram retirados oito animais e coletado sangue para citometria de fluxo e após cinco destes animais foram eutanasiados e necropsiados para coleta de fragmentos de duodeno, jejuno, íleo e ceco que foram acondicionados em formol tamponado 10% e processados de acordo com SMIRNOV *et al.* (2004) para análise de células caliciformes e também fragmentos dos mesmos segmentos que foram rapidamente congelados para posterior análise de células CD4+ e CD8+ de acordo com PICKLER *et al.* (2012).

TABELA 4. Estabelecimento de escores de lesão e os pontos utilizados para avaliar as lesões histológicas.

<b>Tecido<sup>1</sup></b>	<b>Tipo de Lesão</b>	<b>Fator de Severidade</b>	<b>Escore máximo</b>
Lesões Macroscópicas			
Fígado	Coloração amarelada	2	21
	Hipertrofia	2	
	Vesícula repleta	3	
Rins	Hipertrofia	3	12
	Presença de uratos	1	
Musculatura	Hemorragia	1	3
Intestino	Enterites	1	3
Lesões Microscópicas			
Fígado	Desorganização de hepatócitos	1	21
	Vacuolização hepatocelular	1	
	Apoptose	2	
	Megalocitose	2	
	Proliferação de ductos biliares	1	

<sup>1</sup>O escore de cada lesão foi obtido multiplicando-se o fator de severidade pela intensidade e/ou frequência das lesões. O escore dos órgãos foi obtido pela soma de cada escore de lesão. O fator de severidade foi determinado como: 1, lesões leves; 2, lesões moderadas; 3, lesões severas. Adaptado de GRENIER *et al.*, 2011.

Para as análises de linfócitos CD4+ e CD8+, as amostras foram incluídas em gel Tissue-Tek O. C. T. (Miles, Elkhart IN, US), congeladas em nitrogênio líquido, seccionadas com 5µm de espessura em um aparelho criostato e fixadas em lâminas carregadas positivamente em acetona 100%. Em seguida foi realizada a re-hidratação com PBS 0,1M pH 7,6, bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% por 5 minutos e proteína bloqueadora por 8 minutos. Os anticorpos primários utilizados foram Anti-CD4 (CT-4 Southern Biotech 1:100) e Anti-CD8 (CT-8 Southern Biotech 1:100), incubados por 90 minutos a 37° C. Para detecção da reação foi utilizado anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho combinados num mesmo sistema de amplificação, kit ADVANCE®, por 30 minutos. Para revelação da reação utilizou-se cromógeno, kit DAB®, por 30 segundos. As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Meyer, lavadas em água com posterior desidratação e montagem das mesmas. Os linfócitos foram

mensurados em microscopia de luz (Olympus BH2 Olympus America INC, NY, USA), com leitura de 20 campos por tratamento em aumento de 100X.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados obtidos foram analisados pelo programa pelo programa estatístico Statistix for Windows Copyright (C) 2008, usando ANOVA ( $P < 0,05$ ).

## RESULTADOS

Após a segunda semana do período experimental, o ganho de peso das aves recebendo a dieta contendo milho naturalmente contaminado com micotoxinas foi menor que o grupo controle nas 3<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semanas, com reduções significativas ( $P<0,05$ ) de 15%, 17% e 17%, respectivamente (TABELA 5). Não foram observados sinais clínicos de micotoxicose e mortalidade durante todo o experimento. Aos 17 dias observaram-se lesões características de reação vacinal para *Eimeria maxima* em grau leve em 70% dos animais não havendo diferença entre os tratamentos. Entretanto em 60% das aves do grupo alimentado com grãos naturalmente contaminados com micotoxina observaram-se também lesões características de reação vacinal para *Eimeria acervulina*, o que não foi verificado no grupo controle.

TABELA 5. Efeito de dietas contaminadas com aflatoxinas no ganho de peso de frangos de corte.

Dietas	Ganho de peso (g)					
	01 dia	07 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias
T1 <sup>1</sup>	46,8±3,10	190,8±19,32	429,4±19,66 <sup>a</sup>	800,1±54,19	1450,0± 98,32 <sup>a</sup>	2276,1±157,35 <sup>a</sup>
T2	46,9±3,06	187,1±14,65	367,9±57,18 <sup>b</sup>	705,4±86,58	1208,9±138,51 <sup>b</sup>	1900,1±213,98 <sup>b</sup>
Valor P	0,9584	0,4526	0,0008	0,0503	0,0016	0,0016
C.V. <sup>2</sup>	6,58	8,03	10,75	12,16	9,25	9,18

<sup>a, b</sup> Médias das colunas com diferentes letras sobrescritas são significativamente diferentes ( $P<0,05$ ).

<sup>1</sup>T1 = dieta controle sem adição de milho naturalmente contaminado; T2 = dieta com inclusão de milho naturalmente contaminado.

<sup>2</sup> C.V. = Coeficiente de variação.

Os resultados, presentes na TABELA 6, demonstram o efeito dos diferentes tratamentos sobre alterações histopatológicas nos órgãos. Nas aves recebendo a dieta contendo milho naturalmente contaminado foi observado macroscopicamente fígado aumentado, com coloração amarelada, bordas arredondadas e vesícula biliar hipertrofiada (FIGURA 1). Nos rins, notou-se em algumas aves hipertrofia severa,

coloração pálida e presença de uratos. Microscopicamente, os frangos que receberam dieta naturalmente contaminada com micotoxinas apresentaram vacuolização dos hepatócitos, megalocitose e apoptose em graus de severidade que variaram de leve a moderado. Algumas aves do T2 demonstraram ainda hiperplasia de ductos biliares, próximos às áreas portais (FIGURA 2).

TABELA 6. Efeito de dietas com milho naturalmente contaminado sobre alterações macroscópicas de fígado, rins, musculatura e intestino e microscópicas de fígado em frangos de corte de 1 a 35 dias de idade.

Tratamentos		07 dias	17 dias	35 dias
Alterações Macroscópicas				
Fígado	T1 <sup>1</sup>	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,4 ± 0,89 <sup>b</sup>
	T2	0,8 ± 1,09	1,6 ± 0,89 <sup>a</sup>	5,6 ± 3,20 <sup>a</sup>
	Valor de P	0,1411	0,0039	0,0082
Rins	T1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>
	T2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	5,8 ± 2,68 <sup>a</sup>
	Valor de P	1,0000	1,0000	0,0013
Musculatura	T1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,7
	T2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,6 ± 1,14
	Valor de P	1,0000	1,0000	0,3466
Enterites	T1	0,0 ± 0,0	1,2 ± 0,44	0,6 ± 0,54
	T2	0,0 ± 0,0	1,8 ± 0,44	1,6 ± 0,89
	Valor de P	1,0000	0,0667	0,0656
Alterações Microscópicas				
	T1	2,4 ± 0,54	1,40 ± 0,54 <sup>b</sup>	2,0 ± 0,70 <sup>b</sup>
	T2	3,4 ± 0,89	5,80 ± 2,49 <sup>a</sup>	7,2 ± 1,30 <sup>a</sup>
	Valor de P	0,0656	0,0048	0,0001

<sup>a, b</sup> Médias das colunas com diferentes letras sobrescritas são significativamente diferentes (P<0,05).

<sup>1</sup>T1 = dieta controle sem adição de milho naturalmente contaminado; T2 = dieta com inclusão de milho naturalmente contaminado. Metodologia adaptada de GRENIER *et al.*, 2011.





FIGURA 1. Fígado, Frango de corte, 35 dias. T1 = dieta controle e T2 = dieta com milho naturalmente contaminado. Notar alterações de coloração, tamanho e forma de fígado dos animais pertencentes ao T2.

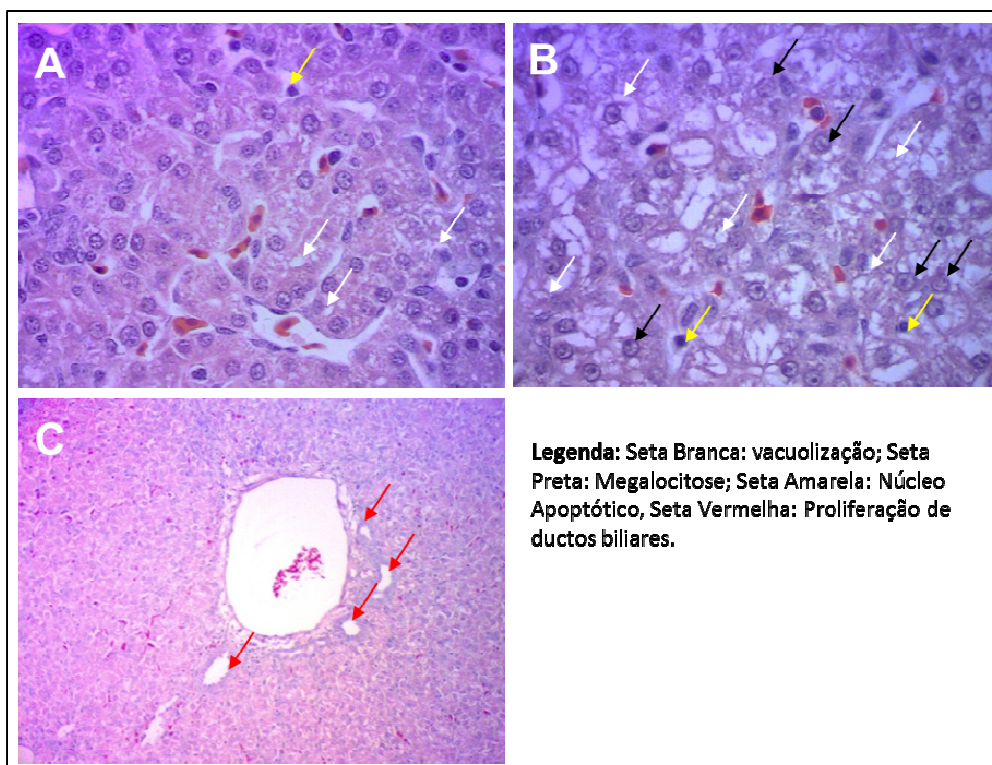


FIGURA 2. Células hepáticas, frango. T1 = dieta controle e T2 = dieta com milho naturalmente contaminado. A - T1 apresentando escore 1 de vacuolização (Aumento de 40x); B - T2 apresentando grau 3 de vacuolização e grau 2 de megalocitose (Aumento de 40x) e C - T2 proliferação de ductos biliares (Aumento de 20x).

No que se refere à dinâmica celular da mucosa intestinal das aves nas diferentes idades, os resultados estão apresentados nas TABELAS 7, 8 e 9. Foi observado que aves do T2, alimentadas com dieta naturalmente contaminadas com micotoxina, apresentaram aumento significativo ( $P<0,05$ ) de células caliciformes no jejuno e ceco aos 7 dias e duodeno aos 17 dias, apresentando redução destas células em relação ao grupo controle no duodeno aos 7 dias e jejuno aos 17 dias. Não houve diferença ( $P<0,05$ ) para as quantidades de células caliciformes nos outros segmentos analisados.

Para os linfócitos T CD4+ foi observado que aves do T2 apresentaram redução significativa ( $P<0,05$ ) nestas células no duodeno aos 7 dias, íleo aos 17 dias, ceco aos 35 dias e jejuno em todas as coletas comparado ao observado no grupo controle. Porém aves do T2 aumentaram ( $P<0,05$ ) a presença de células CD4+ no ceco aos 17 dias e íleo aos 35 dias. As células CD8+ da mucosa de aves do T2 foram significativamente ( $P<0,05$ ) reduzidas quando comparada ao grupo controle em todos os segmentos intestinais das aves aos 7 dias, no duodeno e íleo aos 17 dias e jejuno e ceco das aves aos 35 dias, sendo que somente no íleo de aves aos 35 dias foi possível observar aumento ( $P<0,05$ ) destas células comparado ao grupo controle.

TABELA 7. Contagem de células caliciformes e diferentes fenótipos de linfócitos em fragmentos intestinais, aos 07 dias, de frangos de corte alimentados com dietas contendo milho naturalmente contaminadas por micotoxina.

Tratamentos	Histopatologia e Imunoistoquímica (07 dias)		
	Caliciformes	CD4+	CD8+
		Duodeno	
T1 <sup>1</sup>	33,45±17,35 <sup>a</sup>	9,30±2,38 <sup>a</sup>	5,95±4,14 <sup>a</sup>
T2	17,25±4,52 <sup>b</sup>	6,95±4,24 <sup>b</sup>	0,50±0,88 <sup>b</sup>
Valor de P	0,0003	0,0374	<0,0001
		Jejuno	
T1	21,15±4,04 <sup>b</sup>	3,15±2,94 <sup>a</sup>	10,70±5,51 <sup>a</sup>
T2	27,15±8,00 <sup>a</sup>	1,45±1,73 <sup>b</sup>	0,35±0,81 <sup>b</sup>
Valor de P	0,0048	0,0320	<0,0001
		Íleo	
T1	32,65±6,49	7,00±5,12	10,70±3,86 <sup>a</sup>
T2	34,40±6,03	7,90±3,30	1,15±1,42 <sup>b</sup>
Valor de P	0,3829	0,5136	<0,0001
		Ceco	
T1	10,05±4,14 <sup>b</sup>	7,20±4,42	8,55±4,03 <sup>a</sup>
T2	13,50±4,66 <sup>a</sup>	10,40±7,19	4,05±3,50 <sup>b</sup>
Valor de P	0,0180	0,0984	0,0006

<sup>a, b</sup> Médias das colunas com diferentes letras sobrescritas são significativamente diferentes (P<0,05).

<sup>1</sup>T1 = dieta controle sem adição de milho naturalmente contaminado; T2 = dieta com inclusão de milho naturalmente contaminado.

A FIGURA 3 ilustra a dinâmica populacional de células envolvidas na estruturação da resposta imunológica do TGI ao longo dos dias experimentais. Em relação às células linfóides pode-se notar que ambas aumentam suas contagens conforme as aves vão ficando mais velhas em todos os fragmentos, exceto ceco, o que provavelmente está relacionado ao desenvolvimento fisiológico do sistema imunológico dos animais. Percebe-se também que as células T CD4+ e CD8+, têm populações inferiores no duodeno jejuno e ceco, das aves que foram alimentadas com grãos naturalmente contaminados quando comparada as do grupo controle.

TABELA 8. Contagem de células caliciformes e diferentes fenótipos de linfócitos em fragmentos intestinais, aos 17 dias, de frangos de corte alimentados com dietas contendo milho naturalmente contaminadas por micotoxina.

Histopatologia e Imunoistoquímica (17 dias)			
Tratamentos	Caliciformes	CD4+	CD8+
		Duodeno	
T1 <sup>1</sup>	18,85±3,93 <sup>b</sup>	15,95±4,51	17,20±4,49 <sup>a</sup>
T2	22,70±5,53 <sup>a</sup>	14,70±4,15	13,80±3,25 <sup>b</sup>
Valor de P	0,0155	0,3679	0,0093
		Jejuno	
T1	31,40±9,31 <sup>a</sup>	23,55±5,93 <sup>a</sup>	15,80±6,09
T2	22,20±5,27 <sup>b</sup>	17,15±2,36 <sup>b</sup>	16,05±4,00
Valor de P	0,0004	0,0001	0,8789
		Íleo	
T1	33,90±10,63	23,90±4,37 <sup>a</sup>	24,55±4,85 <sup>a</sup>
T2	28,40±8,68	19,60±4,08 <sup>b</sup>	21,95±2,35 <sup>b</sup>
Valor de P	0,0838	0,0027	0,0374
		Ceco	
T1	13,55±7,47	6,35±4,89 <sup>b</sup>	7,25±3,50
T2	10,10±4,38	11,60±6,01 <sup>a</sup>	6,50±4,00
Valor de P	0,0832	0,0044	0,5325

<sup>a, b</sup> Médias das colunas com diferentes letras sobrescritas são significativamente diferentes (P<0,05).

<sup>1</sup>T1 = dieta controle sem adição de milho naturalmente contaminado; T2 = dieta com inclusão de milho naturalmente contaminado.

TABELA 9. Contagem de células caliciformes e diferentes fenótipos de linfócitos em fragmentos intestinais, aos 35 dias, de frangos de corte alimentados com dietas contendo milho naturalmente contaminadas por micotoxina.

Histopatologia e Imunoistoquímica (35 dias)			
Tratamentos	Caliciformes	CD4+	CD8+
		Duodeno	
T1 <sup>1</sup>	24,6±9,27	17,45±4,19	26,95±5,15
T2	20,15±6,64	16,60±3,07	25,4±6,08
Valor de P	0,0892	0,4684	0,3901
		Jejuno	
T1	31,20±8,73	24,85±6,52 <sup>a</sup>	30,25±6,57 <sup>a</sup>
T2	36,60±11,30	15,75±2,89 <sup>b</sup>	21,35±6,42 <sup>b</sup>
Valor de P	0,0991	<0,0001	0,0001
		Íleo	
T1	40,05±9,88	16,55±5,52 <sup>b</sup>	22,30±4,74 <sup>b</sup>
T2	40,55±9,12	22,25±4,82 <sup>a</sup>	29,00±7,41 <sup>a</sup>
Valor de P	0,8689	0,0013	0,0016
		Ceco	
T1	4,70±3,93	7,35±3,29 <sup>a</sup>	14,50±3,79 <sup>a</sup>
T2	3,35±2,56	4,15±2,47 <sup>b</sup>	11,00±5,06 <sup>b</sup>
Valor de P	0,2062	0,0013	0,0180

<sup>a, b</sup> Médias das colunas com diferentes letras sobrescritas são significativamente diferentes (P<0,05).

<sup>1</sup>T1 = dieta controle sem adição de milho naturalmente contaminado; T2 = dieta com inclusão de milho naturalmente contaminado.

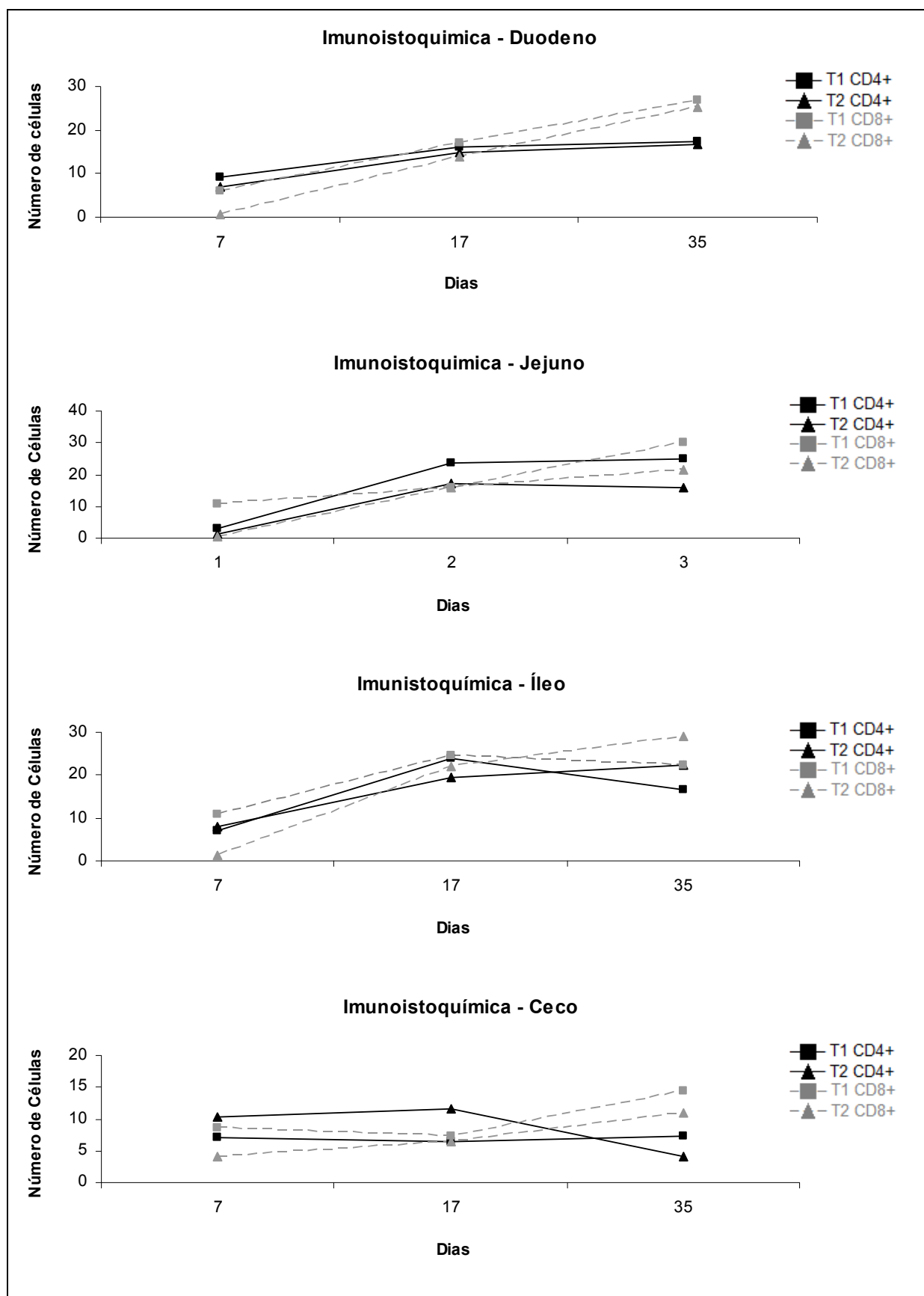


FIGURA 3. Quantificação de linfócitos T CD4+ e CD8+ no duodeno, jejuno, íleo e ceco das aves aos 7, 17 e 35 dias de vida nos diferentes grupos experimentais, sendo T1 aves alimentadas com milho normal e T2 aves alimentadas com milho naturalmente contaminados.

Aos 07 e 17 dias de idade a população de células linfóides do sangue analisadas por citometria de fluxo não diferiu estatisticamente ( $P < 0,05$ ) entre os grupos. Aos 35 dias, linfócitos B e macrófagos ativados circulantes do tratamento que recebeu grãos naturalmente contaminados com micotoxinas na dieta, tiveram menores médias ( $P > 0,05$ ) do que as evidenciadas naquelas aves que não receberam toxina. Já a população de linfócitos T CD8 ativados foi maior significativamente ( $P < 0,05$ ) no grupo intoxicado. Os outros grupos de células não diferiram estatisticamente ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos (TABELA 10).

TABELA 10. Dinâmica populacional de células linfóides no plasma sanguíneo de aves expostas a dietas contendo milho naturalmente contaminado com micotoxinas.

Células Linfóides	Tratamentos - Citometria de fluxo		
	T1 <sup>1</sup>	T2 07 dias	Valor de P
Linfócito B	4,26±2,19	3,53±1,83	0,4855
MØ <sup>2</sup> circulante	1,04±0,75	0,51±0,26	0,1324
MØ ativado	1,61±0,89	1,28±0,73	0,4720
CAANM <sup>3</sup>	11,71±8,24	5,18±2,16	0,0875
CD8 virgem		Anticorpo não funcionou!	
CD8 ativado			
CD4	7,05±3,67	6,38±3,14	0,7048
		17 dias	
Linfócito B	7,23±2,33	10,60±3,93	0,0887
MØ circulante	0,67±0,44	1,34±1,18	0,1615
MØ ativado	2,01±3,41	2,18±1,54	0,9039
CAANM	14,86±9,85	13,24±4,00	0,6921
CD8 virgem	31,20±9,34	35,60±13,05	0,4512
CD8 ativado	5,70±1,88	7,08±1,71	0,1460
CD4	35,11±7,75	35,66±9,26	0,9038
		35 dias	
Linfócito B	15,52±6,66 <sup>a</sup>	6,51±1,98 <sup>b</sup>	0,0029
MØ circulante	2,82±1,90	4,55±3,44	0,2680
MØ ativado	11,92±4,48 <sup>a</sup>	6,22±2,71 <sup>b</sup>	0,0139
CAANM	9,44±6,38	6,04±2,33	0,1550
CD8 virgem	22,18±11,25	24,21±12,99	0,7646
CD8 ativado	9,48±3,21 <sup>b</sup>	18,67±9,39 <sup>a</sup>	0,0418
CD4	36,28±9,04	35,90±5,44	0,9219

<sup>a, b</sup> Médias das colunas com diferentes letras sobrescritas são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

<sup>1</sup>T1 = dieta controle sem adição de milho naturalmente contaminado; T2 = dieta com inclusão de milho naturalmente contaminado.

<sup>2</sup>MØ = macrófagos

<sup>3</sup>CAANM = células apresentadoras de antígenos não macrófagos (células dendríticas)

## DISCUSSÃO

A piora nos parâmetros de produção associados à aflatoxicoses é bastante relatada na literatura, porém GIAMBRONE *et al.*, (1985) utilizando 400 µg/Kg desta toxina purificada na dieta e STRINGHINI *et al.*, (2000) usando milho infestado por fungos com dosagem entre 35 e 70 ppb de AF's, não encontraram diferenças significativas no desempenho zootécnico de frangos de corte que receberam AF's na dieta. No presente trabalho foi detectado menor ganho de peso nas aves que recebiam grãos naturalmente contaminados com micotoxinas na alimentação, porém nenhuma ave apresentou sinais clínicos ou mortalidade. Estes resultados também foram evidenciados por YARRU *et al.*, (2009), MIAZZO *et al.*, (2005) e GIACOMINI *et al.*, (2006) que utilizaram doses altas de AF's purificadas sendo 1, 2,5 e 3 ppm respectivamente e observados ainda por GODOI *et al.*, (2008), utilizando grãos naturalmente contaminados e OGUZ *et al.*, (2000), utilizando toxina pura, que fizeram uso de baixas doses sendo elas 75 e 50 ou 100 ppb respectivamente, também de AF's.

Estes relatos conflitantes em partes podem ser explicados pelas diferenças nos desenhos experimentais, forma purificada ou uso de grãos naturalmente contaminados, distintas qualidade nutricionais de grãos e diferenças de idade e sexo dos indivíduos.

A redução na média do ganho de peso dos animais que recebiam AF's na dieta pode estar relacionada à insuficiência hepática causada por estas toxinas (SHIVACHANDRA *et al.*, 2003). De acordo com DEL BIANCHI *et al.*, (2005) é observado grande acúmulo de AF's em órgãos envolvidos na biotransformação, principalmente fígado e rins. Desta maneira, as alterações presentes nas aves que

foram alimentadas com milho naturalmente contaminado por micotoxinas neste estudo, cujo aflatoxina era preponderante, são também bastante relatadas em intoxicações experimentais de aves domésticas com AF's (RAUBER *et al.*, 2007; GIACOMINI *et al.*, (2006); MIAZZO *et al.*, (2005); SHIVACHANDRA *et al.*, 2003; KLEIN *et al.*, 2002; QUIST *et al.*, 2000).

As alterações observadas, claramente demonstram que o fígado torna-se bastante comprometido em casos de toxinfecção com AF's. Portanto, este comprometimento pode afetar a síntese protéica das proteínas de fase aguda, que são importantes componentes da resposta imunológica (SURAI e DVORSKA, 2005).

A sensibilidade do sistema imunológico a alterações induzidas por micotoxinas parece estar relacionada à vulnerabilidade das células linfóides devido à alta diferenciação e proliferação destas (OSWALD *et al.*, 2005). Mas tem também relação com redução da atividade fagocítica de macrófagos, diminuição da expressão de receptores para LPS sobre estas células e redução da produção de óxido nítrico (MOON e PYO, 2000). No presente estudo, a redução de macrófagos ativados e o aumento da presença de linfócitos T CD8+ no sangue avaliado por citometria de fluxo, associados à redução destes mesmos linfócitos na mucosa intestinal, podem estar relacionado com os dados encontrados na literatura que relatam que as AF's causam redução das atividades funcionais de macrófagos, o que então pode explicar a relação inversa das células CD8+ presentes no sangue e mucosa das aves, pois a interferência na atividade de macrófagos prejudica o recrutamento de células linfóides do sangue para a mucosa intestinal.

GIRISH *et al.*, (2010) fazendo uso de grãos naturalmente contaminados, porém com *Fusarium* micotoxinas, também constataram redução na população de células T CD8+ em tonsila cecal, após 21 dias de exposição. Segundo HARTY *et al.*,



(2000) estas células estão principalmente envolvidas no desenvolvimento de resistência contra patógenos intracelulares, portanto a redução destas células observada nestes estudos pode sugerir que as aves estejam mais susceptíveis a doenças infecciosas.

Outra população de linfócitos que também está presente na mucosa intestinal são as células T CD4+, as quais desempenham papel fundamental na resposta inflamatória deste tecido (WESTENDORF *et al.*, 2010). GIRGIS *et al.*, (2010) utilizando grãos naturalmente contaminados com *Fusarium* micotoxinas e realizando inoculações com *Eimeria maxima*, observou redução nas porcentagens de células T CD4+ nas aves que receberam a combinação destes dois fatores.

No presente experimento, resultados semelhantes foram encontrados, pois todas as aves foram vacinadas contra *Eimerias* spp, mas somente aquelas que receberam milho naturalmente contaminado na dieta, demonstraram redução significativa na quantidade de linfócitos CD4+ nas três coletas em pelo menos dois dos fragmentos intestinais analisados. Complementando estes achados observou-se somente incidência de lesões características de *E. acervulina* nestas mesmas aves, aos 17 dias, quando comparadas aos animais do tratamento controle. Estes resultados podem sugerir que houve atraso na resposta de células CD4+ ou a inibição de seu recrutamento, possivelmente relacionado à redução da produção de interleucinas pelos macrófagos, já relatada na literatura (MOON e PYO, 2000) o que também vai afetar o recrutamento de células CD8+ como apresentado anteriormente.

## CONCLUSÕES

No presente estudo aves alimentadas com dietas contendo milho naturalmente contaminado com 2595 µg/Kg de AFB<sub>1</sub>, 175 µg/Kg de AFB<sub>2</sub>, 10 µg/Kg de AFG<sub>1</sub>, 125 µg/Kg de AFG<sub>2</sub> e 125 µg/Kg de FB<sub>1</sub>, apresentaram redução no ganho de peso das aves aos 14, 28 e 35 dias de idade, hipertrofia renal severa, com coloração pálida e presença de uratos, aumento de tamanho, coloração amarelada e bordas arredondadas no fígado, assim como vesícula biliar repleta.

Além disso, aves alimentadas com dieta com milho naturalmente contaminado com micotoxina apresentaram vacuolização dos hepatócitos, megalocitose e apoptose em graus de severidade que variaram de leve a moderado e hiperplasia de ductos biliares.

No que se refere à dinâmica das células imunológicas do sangue e mucosa do intestino observou-se que aves alimentadas com dieta naturalmente contaminada com micotoxinas apresentaram redução de linfócitos B e macrófagos ativados no sangue, assim como aumento de linfócitos T CD8 ativados e redução da população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no epitélio intestinal.

## REFERÊNCIAS

BARRAUD, L.; DOUKI, T.; GUERRET, S.; CHEVALLIER, M.; JAMARD, C.; TREPO, C.; WILD, C. P.; CADET, J.; COVA, L. The role of duck hepatitis B virus and aflatoxina B1 in the induction of oxidative stress in the liver. *Cancer detection and prevention*, v. 25, p. 192-201, 2001.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. v.16, p.497-516, 2003.

BERTHILLER, F.; DALL'ASTA, C.; SCHUHMACHER, R.; LEMMES, M.; ADAM, G.; KRŠKA, R. Masked Mycotoxins: Determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem Mass spectrometry, *Journal of Agricultural and food chemistry*, v. 53, p. 3421-3425, 2005.

BOUHET, S.; OSWALD, I. P. The effects of mycotoxins, fungal contaminants, on the intestinal epithelial cell-derived innate immune response. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 108, p. 199-209, 2005.

CHAYTOR, A. C.; SEE, M. T.; HANSEN, J. A.; SOUZA, A. L. P.; MIDDLETON, T. F.; KIM, S. W. Effects of chronic exposure of diets with low levels of aflatoxin and deoxynivalenol on growth and immune status of pigs. *Journal of animal science*, v. s/n, p. 1-42, 2010.

CHOWDHURRY, S. R.; SMITH, T. K.; BOERMANS, H. J.; WOODWARD, B. Effects of feed-borne fusarium mycotoxins on hematology and immunology of laying hens. *Poultry Science*, v. 84, p. 1841-1850, 2005.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. Mycotoxins: Risk in plant, animal and human systems. Council for agricultural science and technology Task force n. 139, Ames, IA, 2003.

DEL BIANCHI, M.; OLIVEIRA, C. A. F.; ALBUQUERQUE, R.; GUERRA, J. L.; CORREA, B. Effects of prolonged oral administration of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in broiler chickens. *Poultry science*, v.84, p.1835-1840, 2005.

FIGUEIREDO, A. N. et al. Relação entre densidade e a energia metabolizável aparente (EMAn) das diferentes frações do milho nas dietas para frangos de corte. 2009. Disponível em: <<http://pt.engormix.com/MA-avicultura/nutricao/artigos.htm>> Acesso em: 12/12/2011.

GIACOMINI, L.; FICK, F. A.; DILKIN, P.; MALLMANN, C. A.; RAUBER, R. H.; ALMEIDA, C. Desempenho e plumagem de frangos de corte intoxicados com aflatoxinas. *Ciência rural*, v. 36, n. 1, p. 234-239, 2006.

GIAMBRONE, J. J.; DIENER, U. L.; DAVIS, N. D.; PANANGALA, V. S.; HOERR, F. J. Effects of purified aflatoxin on broiler chickens. *Poultry Science*, v. 64, p. 852-858, 1985.

GIRGIS, G. N.; BARTA, J. R.; GIRISH, C. K.; KARROW, N. A.; BOERMANS, H. J.; SMITH, T. K. Effects of feed-borne *Fusarium* mycotoxins and na organic mycotoxin adsorbent on immune cell dynamics in the jejununm of chickens infected with *Eimeira maxima*. Veterinary immunology and immunopathology, v. 138, p. 218-223, 2010.

GIRISH, C. K.; SMITH, T. K.; BOERMANS, H. J.; KUMAR, P. A.; GIRGIS, G. N. Effects of dietary *Fusarium* mycotoxins on intestinal lymphocyte subset populations, cell proliferation and histological changes in avian lymphoid organs. Food and chemical toxicology, v. 48, p. 3000-3007, 2010.

GODOI, M. J. S.; ALBINO, L. F. T.; ROSTAGNO, H. S.; GOMES, P. C.; BARRETO, S. L. T.; JUNIOR, J. G. V. Utilização de aditivos em rações formuladas com milho normal e de baixa qualidade para frangos de corte. Rev. Bras. Zootecnia, v.37, n.6, p.1005-1011, 2008.

GRENIER, B.; BRACARENSE, A. L.; LUCIOLI, J.; PACHECO, G. D.; COSSALTER, A. M.; SCHATZMAYR, G.; MOLL, W. D.; OSWALD, I. P. Individual and coombed effects of subclinical doses of deoxynivalenol and fumonisins in piglets. Molecular nutrition & food research, v. 55, n. 5, p. 761-771, 2011.

HARTY, J. T.; TVINNEREIM, A. R.; WHITE, D. W. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. Annual review of immunology, v. 18, p. 275-308, 2000.

HARVEY, R. B.; KUBENA, L. F.; HUFF, W. E.; ELISSADE, M. H.; PHILLIPS, T. D. Hematologic and immunologic toxicity of deoxinivalenol (DON)-contaminated diets to growing chickens. Bulletin of environmental contamination and toxicology, v. 46, p. 273-279, 1991.

JIANG, Z. Y.; WOOLLARD, A. C.; WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of  $\text{Fe}^{2+}$  in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. Lipids, v. 26, n. 10, p. 853-856, 1991.

JOHNSON J., REID W. M. Anticoccidial Drugs: Lesion scoring techniques in Battery and Floor-Pen Experiments with chickens. Experimental Parasitology, v. 28: p. 30-36, 1970.

KLEIN, P. J.; VAN VLEET, T. R.; HALL, J. O.; COULOMBE, R. A. Dietary butylated hydroxytoluene protects against aflatoxicosis in turkeys. Toxicology and applied pharmacology, v. 182, p. 11-19, 2002.

MAZZO, R.; PERALTA, M. F.; MAGNOLI, C.; SALVANO, M.; FERRERO, S.; CHIACCHIERA, S. M.; CARVALHO E. C. Q.; ROSA, C. A. R.; DALCERO, A. Efficacy of sodium bentonite as a detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin and fumonisin. Poultry science, v. 84, p. 1-8, 2005.

MEISSONNIER, G. M.; PINTON, P.; LAFFITTE, J.; COSSALTER, A.; GONG, Y. Y.; BERTIN, G.; GALTIER, P.; OSWALD, I. P.; WILD, C. P. Immunotoxicityof aflatoxin B1: Impairment of the cell-mediated response tovaccine antigen and modulation of cytokine expression. Toxicology and applied pharmacology, v.231, p.142-149, 2008.

MOON, E.; PYO S. Aflatoxin B1 inhibits CD14-mediated nitric oxide production in murine peritoneal macrophages. *International journal of immunopharmacology*, v. 22, p. 237-246, 2000.

OGUZ, H.; KORTOGLU, V.; COSKUN, B. Preventive efficacy of clinoptilolite in Broilers during chronic aflatoxin (50 and 100ppb) exposure. *Research in veterinary science*, v. 69, p. 197-201, 2000.

OSWALD, I. P.; MARIN, D. E.; BOUHET, S.; PINTON, P.; TARANU, I.; ACCENSI, F. Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals. *Food additives and contaminants*, v.22, n.4, p. 354-360, 2005.

PICKLER, L.; HAYASHI, R. M.; LOURENÇO, M. C.; MIGLINO, L. B.; CARON, L. F.; BEIRAO, C. B. B; FISCHER DA SILVA, A. V.; SANTIN, E. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, in press 2012.

QUIST, C. F.; BOUNOUS, D. I.; KILBURN, J. V.; NETTLES, V. F.; WYATT, R. D. The effect of dietary aflatoxin on wild turkey poults. *Journal of wildlife diseases*, v. 36, n. 3, p. 436-444, 2000.

RASTOGI, R.; SRIVASTAVA, A. K.; RASTOGI, A. K. Long term effect of aflatoxina B (1) on lipid peroxidation in rat liver and kidney: effect of pricoli and silymarin. *Phytotherapy research*, v. 15, p. 307-310, 2001.

RAUBER, R. H.; DILKIN, P.; GIACOMINI, L. Z.; ARAÚJO DE ALMEIDA, C. A.; MALLMANN, C. A. Performance of turkey poults fed different doses of aflatoxin in the diet. *Poultry science*, v. 86, p. 1620-1624, 2007.

SHIVACHANDRA, S. B.; SAH, R. L.; SINGH, S. D.; KATARIA, J. M.; MANIMARAM, K. Immunosuppression in broiler chickens fed aflatoxin and inoculated with fowl adenovirus serotype-4 (FAV-4) associated with hydropericardium syndrome. *Veterinary research communications*, v. 27, p.39-51, 2003.

SMIRNOV A., SKLAN D., UNI Z. 2004. Mucin dynamics in the chick small intestines are altered by starvation. *J. Nutr.* 134:736-742.

SPEIJERS, G. J. A.; SPEIJERS, M. H. M. Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicology Letters*, v. 153, p. 91-98, 2004.

STRINGHINI, J. H.; MOGYCA, N. S.; ANDRADE, M. A.; ORSINE, G. F.; CAFÉ, M. B.; BORGES, S.A. Efeito da qualidade do milho no desempenho de frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 29, n. 1, p. 191-198, 2000.

SURAI, P. F.; DVORSKA, J. E. Effects of mycotoxin on antioxidant status and immunity. In: DIAZ, D. *The micotoxin blue book* 1 ed. Nottingham, 2005, Cap. 5, p. 93-137.

WESTENDORF, A. M.; FLEISSNER, D.; HANSEN, W.; BUER, J. T cells, dendritic cells and epithelial cells in intestinal homeostasis. International journal of medical microbiology, v. 300, p. 11-18, 2010.

YARRU, L. P.; SETTIVARI, R. S.; GOWDA, N. K. S.; ANTONIOU, E.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, E. Effects of turmeric (*Curcuma longa*) on the expression of hepatic genes associated with biotransformation, antioxidant and immune systems in broiler chicks fed aflatoxin. Poultry science, v. 88, p. 2620-2627, 2009.

YEGANI, M.; KORVER, D. R. Factors affecting intestinal health in poultry. Poultry Science, v. 87, p. 2052–2063, 2008.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As matérias primas utilizadas nas rações animais compõem grande parte dos custos da produção animal. Sabe-se que os grãos, principalmente o milho devido a sua elevada qualidade nutricional, estão sujeitos à contaminação fúngica, onde o desenvolvimento destes nos grãos acarreta em perdas nutricionais e também produção de micotoxinas. Estes cereais com reduzidos padrões de qualidade são frequentemente utilizados nas formulações das dietas de animais de produção devido à alta demanda por parte da agroindústria.

No presente estudo foram avaliados os efeitos de grãos naturalmente contaminados com micotoxinas (aflatoxinas e fumonisinas) e pode-se observar que estes são capazes de provocar alterações nos parâmetros produtivos, no aspecto macroscópico de órgãos, principalmente fígado e rins. Mas a principal alteração está ligada a dinâmica populacional de células linfoides da mucosa intestinal, onde a redução de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> acabam por comprometer a sistema imunológico podendo tornar estes animais mais vulneráveis a agentes patogênicos.

Sendo assim, trabalhos relacionando o consumo destes grãos com alterações imunológicas são de extrema importância visto que estes são capazes de proporcionar os mesmos efeitos observados nos trabalhos que utilizam toxinas purificadas, porém com doses mais baixas.

É importante ainda lembrar que se faz necessário estabelecer padrões de análises destes grãos naturalmente contaminados para que seja possível um melhor entendimento dos efeitos destas matérias primas sobre a saúde e produção animal.